

IN VITRO KULTUR
UND KRYOKONSERVIERUNG PRIMORDIALER
KEIMZELLEN VON NUTZTIEREN

F. Leichthammer

Disbui. München

1989



awi-druck
Dissertations-Druck
Müllerstraße 22 · München 5
Telefon 260 40 05

Das Institut für Tierzucht und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin
Lehrstuhl für Tierärztliche Mikrobiologie
Post. Nr. 10411, D-1000 Berlin

IN VITRO KULTUR UND KRYOKONSERVIERUNG
PRIMORDIALER KEIMZELLEN
VON NUTZTIEREN

IN VITRO KULTUR UND KRYOKONSERVIERUNG
PRIMORDIALER KEIMZELLEN
VON NUTZTIEREN

Frank H. Leichthammer
am Lehrstuhl für Tierärztliche Mikrobiologie der
Tierärztlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

Frank H. Leichthammer

Frank H. Leichthammer

Frank H. Leichthammer

Frank H. Leichthammer

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht:
Prof. Dr. Dr. habil. G. Brem

IN VITRO KULTUR UND KRYOKONSERVIERUNG
PRIMORDIALER KEIMZELLEN
VON NUTZTIEREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Frank H. Leichthammer
aus
Frankfurt am Main

München 1988

Vom dem Institut für Tierrecht und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München
Lehrstuhl für Tierärztliche Rechtslehre
Prof. Dr. Dr. habil. G. Brem

IN VERBAND MIT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
GEFÜHRT VON
KURATOREN

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr.habil. G. Brem
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr.habil. R. Stolla

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND ALLGEMEINES

2. VERFAHREN

2.1	Wiederholungsversuche	1
2.1.1	Einleitung	1
2.1.2	Einleitung	1
2.1.3	Einleitung	1
2.1.4	Einleitung	1
2.1.5	Einleitung	1
2.1.6	Einleitung	1
2.1.7	Einleitung	1
2.1.8	Einleitung	1
2.1.9	Einleitung	1
2.1.10	Einleitung	1
2.1.11	Einleitung	1
2.1.12	Einleitung	1
2.1.13	Einleitung	1
2.1.14	Einleitung	1
2.1.15	Einleitung	1
2.1.16	Einleitung	1
2.1.17	Einleitung	1
2.1.18	Einleitung	1
2.1.19	Einleitung	1
2.1.20	Einleitung	1
2.1.21	Einleitung	1
2.1.22	Einleitung	1
2.1.23	Einleitung	1
2.1.24	Einleitung	1
2.1.25	Einleitung	1
2.1.26	Einleitung	1
2.1.27	Einleitung	1
2.1.28	Einleitung	1
2.1.29	Einleitung	1
2.1.30	Einleitung	1
2.1.31	Einleitung	1
2.1.32	Einleitung	1
2.1.33	Einleitung	1
2.1.34	Einleitung	1
2.1.35	Einleitung	1
2.1.36	Einleitung	1
2.1.37	Einleitung	1
2.1.38	Einleitung	1
2.1.39	Einleitung	1
2.1.40	Einleitung	1
2.1.41	Einleitung	1
2.1.42	Einleitung	1
2.1.43	Einleitung	1
2.1.44	Einleitung	1
2.1.45	Einleitung	1
2.1.46	Einleitung	1
2.1.47	Einleitung	1
2.1.48	Einleitung	1
2.1.49	Einleitung	1
2.1.50	Einleitung	1
2.1.51	Einleitung	1
2.1.52	Einleitung	1
2.1.53	Einleitung	1
2.1.54	Einleitung	1
2.1.55	Einleitung	1
2.1.56	Einleitung	1
2.1.57	Einleitung	1
2.1.58	Einleitung	1
2.1.59	Einleitung	1
2.1.60	Einleitung	1
2.1.61	Einleitung	1
2.1.62	Einleitung	1
2.1.63	Einleitung	1
2.1.64	Einleitung	1
2.1.65	Einleitung	1
2.1.66	Einleitung	1
2.1.67	Einleitung	1
2.1.68	Einleitung	1
2.1.69	Einleitung	1
2.1.70	Einleitung	1
2.1.71	Einleitung	1
2.1.72	Einleitung	1
2.1.73	Einleitung	1
2.1.74	Einleitung	1
2.1.75	Einleitung	1
2.1.76	Einleitung	1
2.1.77	Einleitung	1
2.1.78	Einleitung	1
2.1.79	Einleitung	1
2.1.80	Einleitung	1
2.1.81	Einleitung	1
2.1.82	Einleitung	1
2.1.83	Einleitung	1
2.1.84	Einleitung	1
2.1.85	Einleitung	1
2.1.86	Einleitung	1
2.1.87	Einleitung	1
2.1.88	Einleitung	1
2.1.89	Einleitung	1
2.1.90	Einleitung	1
2.1.91	Einleitung	1
2.1.92	Einleitung	1
2.1.93	Einleitung	1
2.1.94	Einleitung	1
2.1.95	Einleitung	1
2.1.96	Einleitung	1
2.1.97	Einleitung	1
2.1.98	Einleitung	1
2.1.99	Einleitung	1
2.1.100	Einleitung	1

MEINEM VATER

IN HERZLICHER DANKBARKEIT

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
2. LITERATUR	3
2.1 Wesen und Entwicklungsschicksal primordialer Keimzellen	3
2.1.1 Beziehungen zwischen Keimzellen und Soma	3
2.1.2 Terminologie	5
2.1.3 Charakteristika primordialer Keimzellen	8
2.1.3.1 Mitose und Meiose	8
2.1.3.2 Aktivität der X - Chromosomen	8
2.1.3.3 Migration	10
2.1.3.3.1 Anuren und Urodelen	11
2.1.3.3.2 Vögel	11
2.1.3.3.3 Säugetiere	12
2.1.3.4 Zielfindung	14
2.1.4 Identifizierung primordialer Keimzellen	16
2.1.4.1 Alkalische Phosphatase	16
2.1.4.2 Glykogen	19
2.1.4.3 Toluidinblau	20
2.1.4.4 Größe	20
2.2 Gewinnung und in vitro Kultur vitaler primordialer Keimzellen	22
2.2.1 Gewinnung	22
2.2.1.1 Mechanisch	22
2.2.1.2 Enzymatisch / chemisch	23
2.2.1.2.1 Collagenase	23
2.2.1.2.2 EDTA	24
2.2.2 Reindarstellung	25
2.2.2.1 Dichtegradienten-Zentrifugation	25
2.2.2.2 Mikropipette	25
2.2.3 Identifizierung primordialer Keimzellen	26
2.2.3.1 Morphologie	26

2.2.3.2	Alkalische Phosphatase	26
2.2.3.3	Monoklonale Antikörper	27
2.2.4	In vitro Kultur	27
2.2.4.1	Kulturgefäße	27
2.2.4.2	Medien	28
2.2.4.3	Gasgemische	29
2.2.4.4	Temperaturen	29
2.2.5	Beurteilung der Zellen	29
2.2.6	Ergebnisse der in vitro Kultur	30
2.2.6.1	Überlebensrate	30
2.2.6.2	Mitoseaktivität	32
2.2.6.3	Meiose	32
2.2.6.4	Morphologie und Motilität	33
2.2.6.5	Zusammenfassung	33
3.	MATERIAL UND METHODE	35
3.1	Tiermaterial	35
3.1.1	Rinder	35
3.1.2	Schweine	35
3.1.3	Kaninchen	35
3.1.4	Mäuse	36
3.2	Gewinnung der Feten	36
3.2.1	Rinder	36
3.2.2	Schweine	37
3.2.3	Kaninchen	37
3.2.4	Mäuse	38
3.3	Präparation der Gonadenanlagen und Freisetzen der primordialen Keimzellen	38
3.3.1	Gewinnung der Gonadenanlagen	38
3.3.2	Geschlechtsbestimmung	41
3.3.3	Gewinnung der primordialen Keimzellen	42
3.4	Beurteilung der Zellen	43

3.4.1	Visueller Gesamteindruck	43
3.4.2	Nachweis primordialer Keimzellen	43
3.4.3	Vitalitätsprüfung	44
3.5	In vitro Kultur	46
3.5.1	Kulturgefäße	46
3.5.2	Kulturmedien	46
3.5.3	Kulturbedingungen	47
3.6	Kryokonservierung	47
3.6.1	Tiefgefriergefäße	47
3.6.2	Tiefgefriermedien	47
3.6.3	Prozeß des Tiefgefrierens	48
3.6.3.1	Elektronisch gesteuerte Methode	48
3.6.3.2	Konventionelle Methode	49
3.6.4	Auftauen des Zellmaterials	49
3.6.5	Weitere Behandlung	49
4.	ERGEBNISSE	51
4.1	Gewinnung primordialer Keimzellen	52
4.1.1	Gewinnung der Gonaden - Alter der Feten	52
4.1.2	Morphologie der Gonaden (-anlagen) als Kriterium zur Geschlechtsbestimmung der Feten	54
4.1.3	Isolation der primordialen Keimzellen	57
4.1.3.1	Methode der Zellgewinnung	57
4.1.3.1.1	Mechanisch	57
4.1.3.1.2	EDTA / mechanisch	58
4.1.3.2	Morphologie der PKs	58
4.1.3.3	Größe der PKs	62
4.1.3.4	Vitalität der PKs sofort nach ihrer Freisetzung	65
4.2	In vitro Kultur der primordialen Keimzellen	66
4.2.1	Veränderungen der Zellmorphologie	66



4.2.2	Vitalität der PKs nach definierter Dauer der in vitro Kultur	67
4.3	Kryokonservierung	73
4.3.1	Maus	74
4.3.1.1	Vitalität sofort nach dem Auftauen	74
4.3.1.2	In vitro Kultur	74
4.3.2	Rind	76
4.3.2.1	Vitalität sofort nach dem Auftauen	76
4.3.2.1	In vitro Kultur	76
4.3.3	Schwein	76
4.3.3.1	Vitalität sofort nach dem Auftauen	76
4.3.3.2	In vitro Kultur	77
4.3.4	Kaninchen	79
4.3.4.1	Bei -70 C gelagerte PKs	79
4.3.4.1.1	Vitalität sofort nach dem Auftauen	79
4.3.4.1.2	In vitro Kultur	79
4.3.4.2	In LN ₂ gelagerte PKs	81
4.3.4.2.1	Vitalität sofort nach dem Auftauen	81
4.3.4.2.2	In vitro Kultur	81
4.3.5	Ergebnisse der in vitro Kultur im Anschluß an das Auftauen in Relation zu Alter und Geschlecht der Feten	83
4.3.5.1	Maus	84
4.3.5.2	Rind	84
4.3.5.3	Schwein	84
4.3.5.4	Kaninchen	85
4.3.6	Einfluß des Tiefgefriermediums (TGM)	88
4.3.6.1	M 199	88
4.3.6.2	MEM	88
4.3.7	Einfluß des Tiefgefrierprogramms (TGP)	89
4.3.7.1	Elektronisch gesteuert	89
4.3.7.2	Konventionelle Methode	90
4.3.8	Einfluß der Lagerung des tiefgefrorenen Zellmaterials auf dessen Überlebensfähigkeit	91

5. DISKUSSION	93
5.1 Gewinnung primordialer Keimzellen	93
5.1.1 Bedeutung des Zeitverlustes zwischen Schlachtung des Muttertieres und Beginn der Präparation	93
5.1.2 Morphologie und Größe der PKs	94
5.2 In vitro Kultur der PKs	96
5.3 Kryokonservierung	99
5.3.1 Vitalität der PKs sofort nach dem Auftauen	100
5.3.2 In vitro Kultur im Anschluß an das Auftauen	101
5.3.2.1 Ergebnisse der ivK nach dem Auftauen in Relation zum Geschlecht der Feten	102
5.3.2.2 Vitalität der PKs in Relation zum Alter der Feten	103
5.3.2.3 Einfluß des Tiefgefriermediums	104
5.3.2.4 Einfluß des Tiefgefrierprogramms	105
5.3.2.5 Einfluß der Lagertemperatur	106
5.4 Ausblick	107
6. ZUSAMMENFASSUNG	108
7. SUMMARY	110
8. LITERATURVERZEICHNIS	112

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuclease
dpc	diei post coitum
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
HBSS	Hank's Basic Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IvK	In vitro Kultur
LN ₂	Liquid Nitrogen
MEM	Minimum Essential Medium
MH	Whittingham's Medium
M2	Modifizierte Krebs-Ringer-Lösung
NCS	Newborn Calf Serum
o.A.	ohne Angabe
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphat-Buffered-Saline Dulbecco
PK	Primordiale Keimzelle
RS	Rat Serum
RT	Raumtemperatur
sof.	sofort
SSEA	Stage Specific Embryonic Antigen
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
TCM 199, M 199	Tissue Culture Medium 199
TGM	Tiefgefriermedium
TGP	Tiefgefrierprogramm
Wo.	Woche(n)

1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Die primordialen Keimzellen (PKs) finden seit geraumer Zeit im Rahmen umfangreicher Untersuchungen der embryonalen und fetalen Entwicklung der Gonaden bei verschiedenen Tierarten Interesse. Primär wurde die Frage nach dem Entwicklungsschicksal dieser Zellen im Embryo bzw. Fetus, ihre Anzahl und Lokalisation in verschiedenen Zeiträumen der Entwicklung sowie die Möglichkeit einer eindeutigen Identifikation einer Zelle als primordiale Keimzelle bearbeitet.

Während sich die meisten Arbeiten mit fixiertem und für die histologische Untersuchung aufbereitetem Material befaßten und nur wenig über das in vitro Verhalten vitaler PKs bekannt war (HEATH, 1978 a), finden sich in letzter Zeit Veröffentlichungen von Autoren, die mit vitalen PKs arbeiten und verschiedene Möglichkeiten der in vitro Kultur dieser Zellen untersuchen (DE FELICI und McLAREN, 1983; DE FELICI und SIRACUSA, 1985; WABIK-SLIZ und McLAREN, 1984; PRÉPIN et al., 1985). Die Möglichkeiten der Gewinnung, Anfärbung, Reinigung und Überprüfung der Vitalität dieser Zellen bei der Maus wurden von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (DE FELICI und McLAREN, 1982; DONOVAN et al., 1986).

Erste Erfahrungen mit der Tiefgefrierkonservierung von PKs der Maus wurden in eigenen Voruntersuchungen gesammelt (LEICHTHAMMER et al., 1988).

Primordiale Keimzellen (PKs) sind totipotente Zellen; BAUNACK und KELLERMANN (1986) gelang bei der Maus die Verfolgung des Entwicklungsschicksals von PKs nach ihrer Integration in Embryonen, was in frühen Stadien anhand selektiver Färbemethoden möglich war.

Beim Nutztier liegen bislang keine Erkenntnisse darüber vor, ob bzw. wie sich undifferenzierte Keimbahnzellen in vitro

kultivieren oder konservieren lassen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden deshalb folgende Aufgaben (jeweils bei Rind, Schwein und Kaninchen) bearbeitet:

1. Präparative Gewinnung vitaler PKs aus verschiedenen fetalen Entwicklungsstadien und Erfassung der morphologischen Ausprägung,
2. Erarbeitung effizienter Kulturbedingungen mit Erhebung der Überlebensrate und -zeit sowie eventueller Veränderungen (Differenzierung) während der in vitro Kultur,
3. Untersuchung zur permanenten Lagerung der PKs bei -70°C und in flüssigem Stickstoff und Erfassung der Überlebensrate.

Die Erarbeitung geeigneter Kultur- und Konservierungsbedingungen ist eine notwendige Voraussetzung für weiterführende Experimente zur Untersuchung der Entwicklungskapazität von PKs nach Reintegration in Feten bzw. Embryonen.

2. LITERATUR

2.1 Wesen und Entwicklungsschicksal primordialer Keimzellen

2.1.1 Beziehungen zwischen Keimzellen und Soma

Bei der Betrachtung derjenigen Stämme des Tierreiches, in denen sich die Individuen auf sexuellem Wege fortpflanzen, ist das Wesen der Keimbahnzellen eine Kernfrage biologischer Forschung, die auf die Beziehungen zwischen dem Körper (Soma) und den Keimzellen zielt. Dies ist begründet in der Tatsache, daß allein diese Zellpopulation dazu befähigt ist, die Entstehung von Gameten und damit von Nachkommen zu ermöglichen.

McLAREN (1981) betont die historische Bedeutung dieses Forschungsaspektes, zitiert Nussbaum (1880), Weismann (1892) und Darwin (o.J.) und stellt eine eigene Hypothese zu diesen Beziehungen auf.

In Abb. 1 ist eine graphische Darstellung der wichtigsten verschiedenen Modelle der Keimzell-Soma-Relationen wiedergegeben.

Hatte Nussbaum noch eine bestehende Kontinuität zwischen den Keimzellen aufeinanderfolgender Generationen postuliert, (die Keimzellen repräsentierten den Stamm, von dem sich die Individuen nach kurzer Lebensdauer lösten "wie Blätter, die vom Baum fallen"), favorisierte Weismann das weniger präzise und weniger leicht zu überprüfende Keimplasma-Konzept. Diese Hypothese spricht von einem kontinuierlichen Strom unsterblichen Keimplasmas, das in Intervallen in den jeweils "wahren" Keimzellen konzentriert vorliegt und dem in jeder Generation "eine Knospe sterblichen Somas entspringt".

In krassem Gegensatz dazu steht die von Darwin vertretene Theorie einer Aufeinanderfolge von Keimzelle und Soma, die

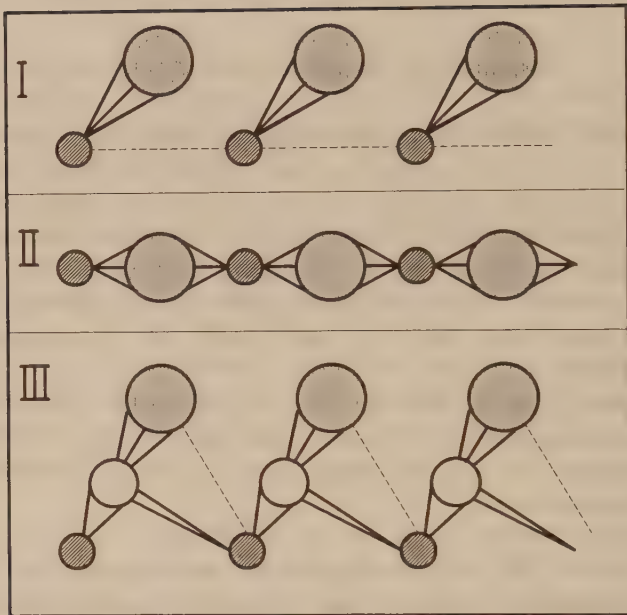


Abbildung 1: Relationen zwischen Keimzellen und Soma nach I.: Weismann, II.: Darwin, III.: McLaren.

dunkelgrau = Keimzelle, hellgrau = Soma, weiß = Epiblast
Erläuterungen im Text. Nach McLAREN (1981).

Anlaß zu der Frage gab, ob das Ei das Mittel des Huhnes sei, ein anderes Huhn zu produzieren oder ob vielmehr das Huhn das Mittel eines Eies sei, ein anderes Ei zu produzieren.

McLAREN (1981) betont den äußerst wichtigen Aspekt der gegenseitigen Beeinflußbarkeit zwischen Soma und Keimbahn, der ja erst seit dem Darwinschen Konzept denkbar ist. Die

vorherigen Hypothesen ließen lediglich eine Beeinflussung des Somas durch die Keimzelle zu, niemals den umgekehrten Fall.

Die Autorin hat aufgrund ihrer Forschungsarbeiten an Mäusen den Epiblasten (das embryonale Ektoderm), den sie den "business part of the embryo" nennt, als wesentliches Element in ihr Konzept aufgenommen. Sie weist darauf hin, daß der Keimzellstamm etwa zum Zeitpunkt der Gastrulation dem Epiblasten entspringt und daß die Keimzellen während ihres Lebens engen Interaktionen mit den sie umgebenden somatischen Zellen unterworfen sind.

Das Wissen um die schädigende Wirkung äußerer Agenzien, die nicht nur somatische Zellen, sondern auch die der Keimbahn betreffen, mahnt nach Ansicht von McLAREN (1983 a) zu vorsichtigem Umgang mit diesem Material.

2.1.2 Terminologie

In der Literatur werden die Begriffe "Primordiale Keimzellen" resp. "Primordial Germ Cells", "Urgeschlechtszellen", "Urkeimzellen" und "Gonozyten" synonym verwendet. Der Übersichtlichkeit wegen wird dem Begriff "Primordiale Keimzellen" (PKs) der Vorzug gegeben.

Die Tatsache, daß viele Autoren sich nicht derselben Terminologie bedienen und daher Mißverständnisse entstehen können, nahmen NIEUWKOOP und SUTASURYA (1979) zum Anlaß, eine Auflistung eindeutiger Benennungen der in definierten Stadien der Gametogenese befindlichen Zellen aufzustellen (Tab. 1).

Der von den Autoren verwendete Begriff der "präsumptiven PK" (pPK), der sich auf Beobachtungen bei Anuren bezieht, wird hier nur beiläufig erwähnt. Man versteht darunter die mutmaßlichen Vorläufer der eigentlichen PKs, von denen nicht bekannt ist, ob sie möglicherweise noch zu einer Entwicklung

Tab. 1: Phasen der Keimzellentwicklung unter besonderer Berücksichtigung ihrer Benennung in verschiedenen Stadien der Gametogenese (nach NIEUWKOOP und SUTASURYA, 1979)

Stadium der Gametogenese	Bezeichnung
I. Frühe Entwicklung bis zur Geschlechtsdifferenzierung	
a) Extragonadale Periode	
1. Absonderung und Determination	pPK*
2. Morphologische Differenzierung	PK
3. Migration	PK
b) Bildung der Gonadenanlage	
4. Kolonisation	PK
c) Indifferente Gonade	
5. Vermehrung	PK
II. Geschlechtsdifferenzierung	
d) Differenzierung in Ovar bzw. Testis	Oogonie, Spermatogonie
6. Oogenese und Spermatogenese: Meiose	Oozyte, Spermatozyte
III. Maturation	Ovum, Spermatozoon
IV. Fertilisation	Zygote

* = präsumptive PK

in andere Zelllinien als der germinalen fähig sind (WYLIE et al., 1985 a).

Nach der Definition von NIEUWKOOP und SUTASURYA (1979) kann von primordialen Keimzellen i.e.S. nur solange gesprochen werden, als das Geschlecht des jeweiligen Individuums phänotypisch weder an der Gonadenanlage noch an den Keimzellen selbst erkennbar ist.

Andere Autoren gehen hiermit, zumindest die männlich determinierten Zellen betreffend, nicht konform:

LANGMAN (1980) spricht im Abschnitt über die Spermatogenese beim Menschen davon, daß erst im Zuge der kurz vor der Pubertät einsetzenden Umwandlung der Keimstränge in Samenkanälchen die PKs zu Spermatogonien werden.

Bei Haustieren bemerkt SCHNORR (1985) zur Differenzierung der PKs zu Spermatogonien allgemein, daß sie während der auf die Geschlechtsdifferenzierung folgenden fetalen und postnatalen Entwicklung stattfindet.

Nach McLAREN (1983 b) treten die männlich determinierten Keimzellen der Maus zwischen dem 13. und 15. Tag post coitum in die mitotische Arretierung ein und werden dann als T-Prospermatogonien bezeichnet.

Wird in der vorliegenden Arbeit davon gesprochen, daß weibliche bzw. männliche PKs gewonnen wurden, geschieht dies nach der gegebenen Definition mit einer gewissen Unsicherheit.

Jedoch wurde in Übereinstimmung mit den meisten der hier zitierten Autoren, die den Begriff der weiblichen bzw. männlichen PK verwenden, im Sinne der Übersichtlichkeit ebenso verfahren.

2.1.3 Charakteristika primordialer Keimzellen

2.1.3.1 Mitose und Meiose

Die Sonderstellung primordialer Keimzellen innerhalb der Gesamtzellpopulation betont O (1978): Während somatische Zellen sich ausschließlich mitotisch teilen können, besitzen die germinalen Zellen die Fähigkeit, über die Meiose ihren Chromosomensatz zu halbieren. Erst hiermit ist eine unbedingte Voraussetzung der sexuellen Fortpflanzung gegeben.

Die Anzahl der PKs nimmt im Zuge der mitotischen Teilungsvorgänge zunächst stark zu, wird dann durch Degeneration wieder reduziert und erreicht bis zum Geburtstermin ein Niveau, dessen Zahlenwert sich zwischen weiter ablaufenden Teilungs- und einsetzenden Degenerationsabläufen einpendelt.

Über die Veränderung der Zellzahlen und die tierartlich unterschiedlichen Größenordnungen gibt Tab. 2 einen Überblick.

2.1.3.2 Aktivität der X - Chromosomen

Bei weiblichen Säugetieren ist festzustellen, daß in Keimzellen beide X-Chromosomen aktiv sind, in somatischen Zellen dagegen nur ein X-Chromosom Aktivität zeigt (O, 1978). Unterschiede dieser Aktivität in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Feten wiesen MONK und McLAREN (1981) bei der Maus nach.

Auf Zusammenhänge zwischen der Reaktivierung des einen, inaktiven X-Chromosoms und der Totipotenz der PKs weisen SNOW und MONK (1983) hin. Diese Reaktivierung setzt zeitgleich mit dem Eintritt in die Meiose ein, d. h. 13-15 dpc (McLAREN, 1983 b).

Tab. 2: Anzahl primordialler resp. differenzierter Keimzellen zu definierten Entwicklungsstadien der Feten, ggf. getrennt nach Geschlecht (Alter in Tagen nach Koitus)

Tierart	dpc	Anzahl	Autor
Maus	8	100-150	CHICQUOINE, 1954
	11	1.575-1.625	ders.
	12	2.000-2.500	ders.
	12	ca. 5.000	BLANDAU et al., 1963
Rind	25	184	JOST und PRÉPIN, 1966
	31	2.381	ders.
Rind, wbl.	50	15.924	ERICKSON, 1966
	110	2.739×10^3	ders.
	170	107×10^3	ders.
	270	$47-89 \times 10^3$	ders.
Schwein, wbl.	20	5.000	BLACK u. ERICKSON, 1963
	30	$50-70 \times 10^3$	dies.
	40	$186-262 \times 10^3$	dies.
	50	$937-1.269 \times 10^3$	dies.
	110	$461-522 \times 10^3$	dies.
Kaninchen	9	6-8	CHRETIEN; 1966
	12	52-93	ders.
	mn1. 16	259	ders.
	wbl. 16	220	ders.
	mn1. 20	4.057	ders.
	wbl. 20	2.347	ders.
	mn1. 26	15.734	ders.
	wbl. 26	10.702-13.907	ders.
	mn1. 28	11.350	ders.
	wbl. 28	7.106-9.407	ders.

2.1.3.3 Migration

Primordiale Keimzellen zeigen, ebenso wie z. B. die Neuronen, ein für die Embryologie bedeutendes Phänomen: die Zellwanderung. Obwohl diese Wanderung bei den Säugetieren anders abläuft als z. B. beim Huhn, beim Seeigel oder bei Drosophila, liegt ihr dennoch bei allen Spezies dasselbe Prinzip zugrunde, nämlich daß das erste Auftreten der embryonalen Keimbahnzellen an anderen Orten zu beobachten ist als ihrer späteren Funktion nach zu erwarten wäre (ALBERTS et al., 1986). Eine Ausnahme stellen lediglich die Cephalochordaten dar, bei denen die PKs in situ auftreten (NIEUWKOOP und SUTASURYA, 1979).

Daß die PKs bei sämtlichen bisher untersuchten Vertebraten außerhalb der Gonaden entstehen und durch aktive Migration während der späteren Entwicklung dorthin gelangen, betonen WYLIE et al. (1979). Die Autoren verweisen auf das generelle Prinzip des "germ cell establishment", wenn auch die exakte Route der PKs auf ihrem Weg zur Gonadenanlage bei den einzelnen Klassen unterschiedlich sein kann.

JEON (1972) widerspricht der Annahme, daß die Dislokation der PKs durch eine aktive Eigenbewegung dieser Zellen bewerkstelligt wird und belegt die Theorie des passiven Transports mit elektronenmikroskopischen Beobachtungen an PKs der Maus, die keine Hinweise auf Charakteristika eigenmotiler Zellen (z. B. Pseudopodien) ergaben.

JEON und KENNEDY (1973) fanden bei licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der PKs 8-11 Tage (Datum des positiven Vaginalplugbefundes = Tag 0) alter Mäuseembryonen nur ausnahmsweise (am 9. Tag) solche mit pseudopodienähnlichen Fortsätzen.

NIEUWKOOP und SUTASURYA (1979) konstatieren dagegen für alle

Säugetiere das Vorhandensein zytoplasmatischer Lobo- bzw. Filopodien. Andere Untersuchungen belegen das Vorhandensein der typischen Blasenbildung (DE FELICI et al., 1985; BRINSTER und HARSTAD, 1977) sowie von Pseudopodien (EDDY et al., 1981; CLARK und EDDY, 1975) fotografisch.

Obwohl die Kenntnis der genauen Mechanismen dieser Migration, insbesondere das Wissen um die beteiligten Moleküle der Zelloberfläche, das Substrat und die Orientierung der Zellen noch unvollständig ist (WYLIE et al. 1985 b), sind die grundlegenden Prinzipien des Vorganges bekannt.

EDDY et al. (1981) berichten ebenfalls, daß es trotz jahrzehntelanger Forschungsarbeit bisher nicht gelungen ist, die an der Migration beteiligten Mechanismen und die sie kontrollierenden Faktoren in toto zu ergründen.

2.1.3.3.1 Anuren und Urodelen

Bei Rana lassen die bereits im 2-Zellstadium am vegetativen Pol erkennbaren RNS-haltigen Plasmaeinschlüsse die weitere Verfolgung des Schicksals der Urkeimzellen zu. Bei Urodelen entstammen die PKs der animalen Keimhälfte und wandern im Seitenplattenmesoderm (FIORONI, 1987).

2.1.3.3.2 Vögel

Beim Vogelkeim liegen die PKs zeitweilig in der sog. mesodermfreien Sichel (STARCK, 1975). Von dort aus gelangen sie über das Zirkulationssystem in die Genitalleiste (FIORONI, 1987; NODEN und DELAHUNTA, 1985). Wenn auch der Transport der PKs der Vögel über weite Strecken passiv erfolgt, bedarf es dennoch aktiver Beweglichkeit dieser Zellen, um zunächst in das Kapillarsystem hinein- und später wieder herausgelangen

zu können (ENGLAND, 1983; WARTENBERG, 1983).

2.1.3.3.3 Säugetiere

Bei Säugetieren sind PKs zunächst im Dottersackepithel in unmittelbarer Nähe der Allantoisbasis vorzufinden, von wo aus sie über das Enddarmbindegewebe ins dorsale Mesenterium wandern und über die Nierenanlage in die Genitalleiste gelangen (SCHNORR, 1985).

WARTENBERG (1983) hält es für unwahrscheinlich, daß PKs großer Säugerembryonen den weiten Weg vom Dottersack zur Genitalfurche (beim Rind mehr als 1 mm, bei der Maus nur 10-50 μm !) allein durch Eigenmotilität zurücklegen können und hat an Rinderembryonen Beobachtungen gemacht, die für eine Beteiligung des Kreislaufsystems sprechen.

Bei Untersuchungen zu der Frage, ob bei der Entstehung von Freemartins eine evtl. Beteiligung des Austausches primordialer Keimzellen zwischen den Zwillingen anzunehmen sei, fanden JOST und PRÉPIN (1966) im Kreislaufsystem boviner Feten geringe Mengen AP-positiver Zellen.

NODEN und DELAHUNTA (1985) berichten ebenfalls davon, daß bei Säugetieren der Übertritt einiger PKs ins Kreislaufsystem beobachtet wurde, betonen jedoch, daß kein Beweis für eine auf diese Weise erfolgende Gonadenbesiedlung vorliegt.

Der jeweils kurz umrissene Ablauf der Migration bei Anuren, Urodelen, Vögeln und Säugetieren ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

Beim Säuger kann die Migration hinsichtlich des Verhaltens der PKs in drei Phasen betrachtet werden (HEATH, 1978 a):

I. Bewegung vom Dottersack zum Enddarm; hier ist eine passive Wanderung der PKs infolge der Enddarminstülpung und Drehung

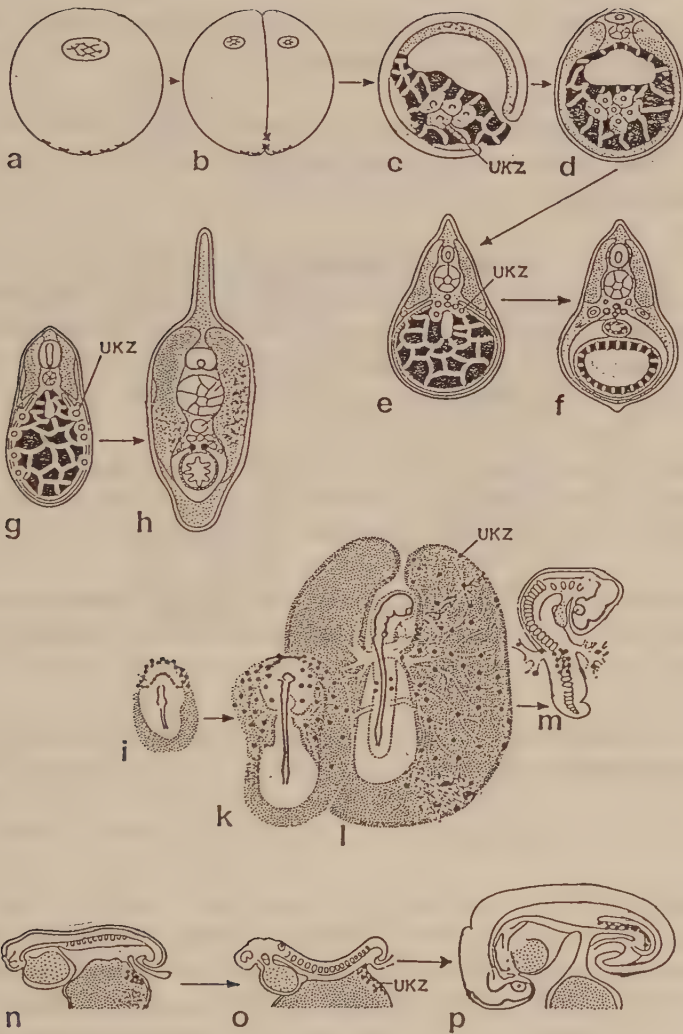


Abbildung 2: Lageveränderung der PKs bei Anuren (a - f), Urodelen (g,h), Vögeln (i - m) und Säugetieren (n - p). UKZ=Urkeimzellen=PKs. Erläuterungen im Text. Nach FIORONI (1987).

des Embryos zu beobachten. Die PKs zeigen keine Anzeichen unabhängiger Motilität.

II. Vorwärtsgerichtete Bewegung entlang des Enddarms; hierbei ist eine durch Pseudopodien vermittelte amöboide Fortbewegung nachgewiesen.

III. Dorsal aus dem Enddarmbereich heraus und lateral über die Zoelomwinkel in den Bereich der Genitalleisten gerichtete Bewegung; auch hier wird ein aktives amöboides Vorwärtsskommen für wahrscheinlich gehalten, da auch bereits in der Gonadenanlage befindliche PKs dieses Verhalten noch zeigen.

Diese prinzipielle Untergliederung in frühe, passive und späte, aktive Wanderung findet sich auch bei NIEUWKOOP und SUTASURYA (1979) sowie bei SNOW und MONK (1983).

DONOVAN et al. (1986) wiesen die aktive Beweglichkeit von Mäuse-PKs in vitro nach und unterteilten die PK-Population in einen "migratory"- und einen "postmigratory"-Typ.

Den Ablauf der Migration primordialer Keimzellen beim Säugetierfeten gibt Abb. 3 wieder.

2.1.3.4 Zielfindung

HEATH (1978 a) geht auch der Frage nach, wodurch die Zielfindung der PKs vermittelt sein könnte. Einerseits werden chemotaktisch wirksame Substanzen diskutiert, andererseits die "contact guidance", womit eine durch Zellkontakt der PKs mit bestimmten somatischen Zellen, z. B. Enddarmepithelien, bewirkte Orientierung in Richtung auf die Gonadenanlage zu verstehen ist. Die Bedeutung des Kontaktes der PKs von *Xenopus laevis* mit dem Zoelomepithel beschreiben HEASMAN und WYLIE (1981) sowie HEASMAN et al. (1981).

WYLIE et al. (1979) untersuchten die Migration von PKs bei

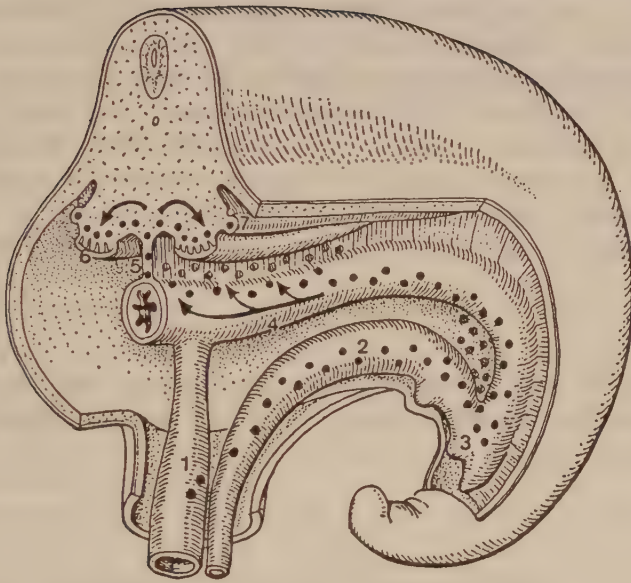


Abbildung 3: Ablauf der Migration von Säugetier-PKs.

1: Dottersackstiel, 2: Allantois, 3: Kloake, 4: Enddarm,
5: Mesenterium, 6: indifferente Gonadenanlage, 7: Urnierengang. Nach SCHNORR (1985).

Xenopus laevis in vitro und fanden Anhaltspunkte dafür, daß das als Substrat verwendete Zellmaterial aus adultem Darmmesenterium von *Xenopus* entscheidenden Einfluß auf die wandernden Zellen hat.

In Anbetracht der z.T. erheblich weiten Wegstrecken, die PKs bei Embryonen großer Säugetiere zurückzulegen haben, hält WARTENBERG (1983) die Theorie der Chemotaxis für unwahrscheinlich.

Dagegen berichten EDDY et al. (1981) von Transplantationsversuchen, die ein nichtspezies-spezifisches chemotaktisches Agens für wahrscheinlich halten lassen. Hierbei wurden Enddarmabschnitte von 9,5 Tage alten Mäuseembryonen in das Coelom 2,5 Tage alter Hühnerembryonen verpflanzt und zu unterschiedlichen Stadien der weiteren Entwicklung untersucht. Es zeigte sich, daß PKs der Mäuse im Bereich der Mesonephren, des Mesenteriums, der Genitalfalte und auch in den Gonaden des Wirts vorzufinden waren (ROGULSKA et al., 1971).

In Tab. 3 sind Daten zur Organentwicklung und Geschlechtsdiagnose bei Embryonen bzw. Feten und der Migration der PKs gegenübergestellt.

2.1.4 Identifizierung primordialer Keimzellen

Bei Säugetieren lassen sich die PKs sowohl anhand ihrer Größe von den kleineren somatischen Zellen unterscheiden (SCHNORR, 1985) als auch anhand ihres hohen Gehaltes an Glykogen und Alkalischer Phosphatase (SCHNORR, 1985; NODEN und DELAHUNTA, 1985).

2.1.4.1 Alkalische Phosphatase (AP)

Als spezifischer Marker für PKs der Maus und anderer Säuger ist der Nachweis der AP hinlänglich beschrieben (CHIQUEINE, 1954; BLANDAU et al., 1963; OZDZENSKI, 1967; OZDZENSKI, 1969; JEON und KENNEDY, 1973; CLARK und EDDY, 1975; TAM und SNOW, 1981; EDDY und HAHNEL, 1983; WYLIE et al., 1985 b; DE FELICI et al., 1985). Welche biologische Rolle die AP für die PKs in vivo spielt, konnte bisher nicht geklärt werden (HEATH, 1978 a).

Tab. 3: Daten zur Wanderung und Kolonisation primordialer Keimzellen (Zahlenangaben in dpc)

	Kanin.	Schwein	Rind	Maus
Erstmaliges Auftreten von PKs	9 ^a			8 ^d
Erreichen der Genitalleiste bzw. Rand d. Mesonephr.	12-14 ^a	18 ^b	25-31 ⁱ	10-11 ^d 12-13 ^e
Bildung der Primitivgonade		24-25 ^b	32 ⁱ 30 ^c	10-11 ^e
Kolonisation abgeschlossen	18 ^a		34 ⁱ	12 ^f 13,5 ^g
Geschlechts-trennung möglich	16 ^h 20 ^a	27 ^b	39-41 ^c	12-13 ^d

^a GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN, 1973

^b BLACK und ERICKSON, 1963

^c KREHBIEL, 1963

^d MONK und McLAREN, 1981

^e CLARK und EDDY, 1975

^f BLANDAU et al., 1963

^g TAM und SNOW, 1981

^h CHRETIEN, 1966

ⁱ JOST und PRÉPIN, 1966

HEATH (1978 a) betont die Bedeutung der histochemischen Identifizierung der PKs anhand des AP-Nachweises vor allem für die seit geraumer Zeit geführte Diskussion über Herkunft und Entwicklung dieser Zellpopulation.

Diese Technik ist in Veröffentlichungen über PKs der Maus detailliert beschrieben; sie kann aber nach HEATH (1978 a) auch bei anderen Säugetierarten generell angewendet werden. Ein Versagen der Marker-Funktion der AP ist bisher nur beim Kaninchen beschrieben (CHRETIEN, 1966).

Bei Untersuchungen fetaler Gonaden bei Rindern fanden GROPP und OHNO (1966), daß bei dieser Spezies auch das primordiale Gonadenparenchym und dessen Derivate AP-positiv reagieren. Der somatische Teil der indifferenten Gonade verfügt über eine AP-negative periphere Zone und einen großen AP-positiven zentralen Bereich. Diese Tatsache erschwert die histochemische Darstellung der PKs nach deren Einwanderung.

HEATH (1978 a) zeigt aber auch die limitierenden Faktoren beim Einsatz des AP-Nachweises als Marker auf:

I. Die AP ist nicht nur in PKs aktiv; in Darmepithelien und Zellen des sich entwickelnden Nervensystems ist sie ebenso nachzuweisen. Auf diese Einschränkung weisen auch JOST und PRÉPIN (1966) hin, die polymorphe AP-positive Zellen in Lebern 26 - 34 Tage alter Rinderfeten fanden und diese dem hämatopoetischen System zuordneten.

II. Verschiedene Formen der AP wurden durch immunologische, elektrophoretische und sonstige Untersuchungen nachgewiesen. Welche Form(en) in PKs vorliegen, ist unbekannt.

III. Zellkulturversuche haben gezeigt, daß die Expression der AP durch bestimmte, exogene Agenzien beeinflusst werden kann. Hierbei handelt es sich um cAMP, kurzkettige Fettsäuren sowie Steroid- und Polypeptidhormone. Setzt man voraus, daß diese Faktoren in vivo ebenfalls entsprechende Wirkung zeigen, kann

ein mißlungener Nachweis der AP-Aktivität auch als Folge fehlender Inducer-Substanzen interpretiert werden.

IV. In vitro zeigte sich ebenfalls, daß einzelne Zyklusphasen der Zellen Einfluß auf die AP-Aktivität haben. Daher könnten sich z. B. in der Metaphase der Mitose befindliche PKs dem histochemischen Nachweis entziehen.

Für die Erforschung des Ursprungs der PKs ist die Methode der Darstellung dieser Zellen mittels der Anfärbbarkeit durch AP-Aktivität allerdings von untergeordneter Bedeutung, weil sie naturgemäß erst ab jenem Zeitpunkt ein positives Ergebnis liefern kann, zu dem dieses Enzym in den Zellen synthetisiert wird. Die Lokalisation der Vorläuferzellen bleibt dabei unentdeckt (EDDY et al., 1981; WYLIE et al., 1985 b).

NIEUWKOOP und SUTASURYA (1979) weisen darauf hin, daß die PKs der Säugetiere nicht in jedem Entwicklungsstadium eine positive AP-Reaktion zeigen.

Da der Nachweis der AP beim Vogelembryo zwar gelingt, das Enzym aber nur eine sehr schwache Aktivität zeigt (NIEUWKOOP und SUTASURYA, 1979), ist er zur Identifizierung der PKs beim Vogel nicht geeignet. Außerdem fanden CHIQUOINE und ROTHENBERG (1957), daß die AP beim Huhn ziemlich gleichmäßig auf alle embryonalen Zellen verteilt ist und somit nicht der spezifischen Darstellung der PKs dienen kann.

2.1.4.2 Glykogen

PKs der Vögel sind reich an Glykogen und können daher anhand der PAS-Färbung selektiv dargestellt werden (MEYER, 1964; NIEUWKOOP und SUTASURYA, 1979).

Bei der PAS-Reaktion geben die durch Oxydation mit Hilfe von

Perjodsäure entstehenden freien Aldehydgruppen von Zucker mit dem Schiffschen Reagens eine Rotfärbung. Damit lassen sich Glykogen, Glykolipide und Glykoproteine nachweisen (LEONHARDT, 1977).

Das in Säuger-PKs gefundene PAS-positive Material ist nicht zellspezifisch und ist bei weiblichen Individuen mit dem Einsetzen der Meiose und bei männlichen im weiteren Verlauf der Spermatogenese nicht mehr nachweisbar (NIEUWKOOP und SUTASURYA, 1979).

Glykogen ist bei PKs von Rind und Schaf nicht immer nachweisbar (RÜSSE, 1978) bzw. liegt beim Rind in zu geringer Menge vor (OHNO und GROPP, 1965) und ist somit nicht als geeigneter Marker für PKs anzusehen.

2.1.4.3 Toluidinblau

Die Tatsache, daß migrierende PKs eine ausgeprägte Basophilie und somit eine selektive Affinität zu Toluidinblau zeigen, machten sich SPIEGELMAN und BENNETT (1973) sowie ZAMBONI und MERCHANT (1973) bei der Darstellung dieser Zellpopulation zunutze.

2.1.4.4 Größe

Mehrere Autoren beschreiben den erheblichen Größenunterschied zwischen PKs und somatischen Zellen ihrer Umgebung als typisches Merkmal dieser Zellpopulation, jedoch ohne dabei im Einzelfall konkrete Maße anzugeben (CHIQUEINE, 1954; SCHNORR, 1985).

HARDISTY (1967) gibt für die meisten Vertebraten einen Zelldurchmesser der PKs von 10-20 μm an; beim Vogel 16-18 μm und beim Säuger 13-14 μm .

Für einzeln liegende PKs von Rind und Schaf gibt RÜSSE (1978) als Durchmesser 10-12 μm bzw. ca. 30 μm (1983) an.

NIEUWKOOP und SUTASURYA (1979) nennen allgemein für den Durchmesser Maße von 10-20 μm , wobei Variationen gegeben sind durch Spezies, Entwicklungsstadium und Zellform.

BRINSTER und HARSTAD (1977) haben für den Durchmesser von PKs der Maus (15 dpc) Werte zwischen 10 und 17 μm gemessen, durchschnittlich 13,6 μm .

CLARK und EDDY (1975) sprechen von 12-14 μm bei PKs der Maus, ebenfalls in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium (beim niedrigsten Wert befinden sich die Zellen noch im Bereich des Dottersackentoderms, beim höchsten bereits in der Keimleiste).

SPIEGELMAN und BENNETT (1973) beobachteten PKs der Maus mit 10-13 μm Durchmesser über den gesamten Migrationszeitraum hinweg und 12-13 μm (vereinzelt bis 20 μm) für Zellen, die bereits in der Gonade eingekistet waren.

Für PKs beim Huhn gibt MEYER (1964) 12-14 μm als Durchmesser der im Blutgefäßsystem befindlichen Zellen und bis zu 25 μm der Zellen im Bereich der Gonadenanlagen an.

PELLINIEMI (1975) fand in 21-27 Tage alten Schweineembryonen PKs mit einem Durchmesser von 10-20 μm .

2.2 Gewinnung und in vitro Kultur vitaler PKs der Maus

Die Untersuchungen der bislang zitierten Autoren beziehen sich auf Material, das für licht- oder elektronenmikroskopische Beobachtungen fixiert worden war. Über Forschungsergebnisse von Arbeiten mit vitalen PKs von Säugetieren liegen nur wenige Veröffentlichungen vor. Hierbei konzentrieren sich die bisherigen Untersuchungen aus naheliegenden Gründen auf Labortiere. Genaue Beschreibungen von Versuchen, isolierte PKs in vitro zu kultivieren, liegen nur über Zellen der Maus vor. HEATH (1978 a) berichtet lediglich, PKs der Ratte für eine Woche kultiviert zu haben.

RIVELIS et al. (1976) und PRÉPIN et al. (1985) untersuchten PKs der Ratte, die nach der in vitro Organkultur der integren Gonaden freigesetzt worden waren.

McLAREN (1983 b) kultivierte Gonaden von Mäuseembryonen der Altersstufen 11,5-15,5 dpc für 4-5 Tage, um den Einfluß des in einigen Fällen an den Gonaden belassenen Mesonephrogewebes auf die Entwicklung der PKs zu untersuchen. Hierbei zeigten diejenigen PKs, die in Gonaden mitsamt anhängenden Mesonephren kultiviert worden waren, ein Verhalten, das den in vivo Vorgängen entsprach.

2.2.1 Gewinnung

2.2.1.1 Mechanisch

DONOVAN et al. (1986) präparierten die PK-enthaltenden Teile der Embryonen in $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -freiem PBS, wuschen sie einige Male in frischem PBS und zerrieben die Fragmente mehrfach in PBS, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten.

Die Punktion der Gonaden mit feinen Nadeln bzw. deren Zer-

quetschen zwischen silikonisiertem Objektträger und Deckglas beschreiben DE FELICI und McLAREN (1982). Hieraus resultierte eine relativ geringe Ausbeute an PKs verbunden mit einer hohen Kontamination (40-50 %) mit somatischen Zellen, vor allem Erythrozyten. Der Anteil nicht lebensfähiger Zellen in der Suspension betrug 35-50 %.

Nach HEATH (1978 a) werden die isolierten Gonaden zwischen silikonisiertem Objektträger und Deckglas bis zur Ruptur komprimiert und die PKs mit Medium gewonnen, das zwischen beide Gläser gespült wird.

BRINSTER und HARSTAD (1977) benutzten zur Gewinnung der PKs ebenfalls einen Objektträger, durch den ein leichter Druck auf die in einer Petrischale befindlichen Gonaden ausgeübt wurde. Die freigesetzten PKs wurden zur Weiterbehandlung mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette aufgenommen.

2.2.1.2 Enzymatisch / Chemisch

2.2.1.2.1 Collagenase

DE FELICI und McLAREN (1982) behandelten Gruppen von 10 - 15 Gonaden für 15 Minuten mit Collagenase Typ 1 (Sigma, 1mg/ml in serumfreiem MH-Ca,Mg), nachdem sie in Hepes-gepuffertem Whittingham's Medium ohne Ca^{++} und Mg^{++} (MH-Ca,Mg) gespült worden waren. Anschließend spülten sie das Material dreimal in MH-Ca,Mg, dem 10 $\mu\text{g/ml}$ DNase (Sigma) zugegeben waren, zentrifugierten die Suspension und nahmen die Zellen in frischem MH/FCS auf.

Das Ergebnis dieser Methode belief sich auf einer bis zu 20fach erhöhten Ausbeute an PKs gegenüber der mechanischen und einer bis zu 4fach erhöhten gegenüber der EDTA - Methode (siehe unten). Die Zelloberfläche der PKs wurde durch das Enzym offensichtlich alteriert, was sich in einem ungewöhnlichen Adhäsionsverhalten der Zellen äußerte. Der prozentuale

Anteil lebender Zellen war gering im Vergleich zu den mittels EDTA gewonnenen Zellen (Collagenase: durchschnittl. ca. 49 %, EDTA: durchschn. ca. 65 %).

HEATH (1978 a) lehnt die enzymatische Behandlung der Gonaden ab, da sie unnötig, potentiell toxisch für die PKs und für manche Experimente unerwünscht sei.

2.2.1.2.2 EDTA

WABIK-SLIZ und McLAREN (1984) gewannen die Gonaden in PBS (PB1) und inkubierten sie für 10-15 Minuten in einer 0,02 % EDTA-Lösung. Anschließend wurden die PKs durch Gonadenpunktion mit einer feinen Nadel freigesetzt.

Diese Methode wurde bereits von DE FELICI und McLAREN (1982; 1983) beschrieben, die hierbei sowohl eine größere Ausbeute an PKs als auch einen größeren Prozentsatz lebensfähiger Zellen fanden als bei der rein mechanischen Gewinnung. Die Reinheit der PK-Population war bei weiblichen Gonaden höher als bei männlichen, da letztere aufgrund der bereits vorhandenen Blutgefäße eine höhere Kontamination mit Erythrozyten aufwiesen. Die PKs lagen als Einzelzellen oder in Aggregaten vor; die Verklumpungen konnten durch vorsichtiges Pipettieren aufgelöst werden.

DE FELICI und SIRACUSA (1985) sowie DE FELICI et al. (1985) inkubierten die Gonaden vor der Punktion für 10-15 Minuten in einer 0,01 %igen EDTA-Lösung.

2.2.2 Reindarstellung

2.2.2.1 Dichtegradienten-Zentrifugation

Um Zellen, Zellorganellen und Makromoleküle sauber voneinander trennen zu können, bedient man sich u. a. der Methode der Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierbei werden die zu trennenden Partikel z. B. in einem Kulturmedium suspendiert und diese Suspension wird mit einem speziellen Dichtegradienten-Medium vermischt. Mittels verschiedener Über- und Unterschichtungsmethoden werden bei anschließender Zentrifugation die einzelnen Elementgruppen unterschiedlicher Dichte voneinander getrennt und stehen somit in großer Reinheit zur Verfügung (STERNBACH, 1982; SHEELER, 1981; PERTOFT et al., 1977; PERTOFT und LAURENT, 1977; PRETLOW II und PRETLOW, 1977).

DE FELICI und McLAREN (1982) beschreiben die Methode der Dichtegradienten-Zentrifugation als Möglichkeit, auch PKs als Reinpopulation zu erhalten. Hierbei wurde die Stammlösung (Percoll) zunächst mit zehnfach konzentriertem MH isotonisch gemacht und anschließend mit MH zu Lösungen von 65, 25 und 12 % verdünnt. Die Zellsuspension wurde der 25 %igen Lösung beigegeben, die 2,5 % FKS und 10 µg/ml DNase enthielt. Dieses Gemisch wurde auf die 65 %ige Lösung geschichtet und mit der 12 %igen überschichtet. Nach dem Zentrifugieren bei 200 g für 20 Minuten wurden Fraktionen von 0,1 ml entnommen und auf deren Zellgehalt untersucht. Nach dem Waschen in Frischmedium lagen PKs in 80 bis 90 %iger Reinheit und einem Anteil von über 90 % lebensfähiger Zellen vor.

2.2.2.2 Mikropipette

Nach der Freisetzung sammelten DE FELICI und SIRACUSA (1985) die PKs mittels einer Mikropipette, die über einen Mund-

schlauch kontrolliert wurde.

Dieselbe Methode wenden BAUNACK (1986) und McLAREN (1987) an.

HEATH (1978 a) beschreibt, daß die PKs nach dem Sammeln mittels Mikropipette in einem Reinheitsgrad von 75-95 % vorzufinden seien und daß die restliche Kontamination durch somatische Zellen durch eine ca. zweistündige Kultur in serumhaltigem Medium zu beseitigen sei. Die somatischen Zellen hätten sich nach dieser Zeit nämlich am Boden des Kulturgefäßes abgesetzt und der Überstand enthielte PKs in 99-100 %iger Reinheit.

2.2.3 Identifizierung primordialer Keimzellen

2.2.3.1 Morphologie

PKs aller untersuchten Stadien weisen eine enorme Größe auf (DE FELICI, 1984), wobei jedoch keine Maße angegeben werden. DE FELICI und McLAREN (1982; 1983) betonen, daß außer der Größe eine charakteristische Blasenbildung sowie pseudopodienähnliche Zellextensionen auffallen.

2.2.3.2 Alkalische Phosphatase

Um sicherzustellen, daß es sich bei den nach morphologischen Kriterien ausgesuchten Zellen tatsächlich um PKs handelte und um den Reinheitsgrad der Zellsuspension zu ermitteln, bedienten sich DE FELICI und McLAREN (1982; 1983) der von BRINSTER und HARSTAD (1977) beschriebenen Methode der AP-Färbung. Dazu steht ein Testkit (Sigma) zur Verfügung, der die Durchführung der Färbung erleichtert. Durch das verwendete "Fast Blue RR Salt" werden die AP-positiven Zellen

dunkelblau gefärbt.

Die mit monoklonalen Antikörpern markierten PKs (siehe unten) wurden von DONOVAN et al. (1986) auf AP-Aktivität gegengefärbt und ließen somit Rückschlüsse auf Unterschiede bezüglich Enzymaktivität bzw. Beschaffenheit der Oberflächenantigene zu.

2.2.3.3 Monoklonale Antikörper

DONOVAN et al. (1986) markierten die Mäuse-PKs für ihre in vitro Kulturversuche mit verschiedenen Antikörpern und protokollierten die temporär unterschiedliche Reaktionsfähigkeit. Erprobt wurden u. a. PG-1, dessen Reaktivität mit PKs der Maus bereits HEATH (1978 b) beschrieb, sowie die bereits bei Untersuchungen an murinen Präimplantationsembryonen und Teratocarcinom-Stammzellen verwendeten SSEA-1 (SOLTER und KNOWLES, 1978) und SSEA-3 (SHEVINSKY et al., 1982).

2.2.4 In vitro Kultur

2.2.4.1 Kulturgefäße

DONOVAN et al. (1986) verwendeten Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen (Costar) und Petrischalen für die Zellkultur (30 mm Durchmesser).

DE FELICI und McLAREN (1983) benutzten Petrischalen aus Plastik, die in einigen Versuchen mit Gelatine (0,1%) oder Agar (0,2%) beschichtet worden waren, und Mikrottest-Platten (Falcon).

2.2.4.2 Medien

Für die in vitro Kultur von PKs verwendete HEATH (1978 a) Standard-Gewebekulturmedien auf MEM-Basis mit Zusatz von FKS.

WABIK-SLIZ und McLAREN (1984) benutzten modifiziertes M 199 mit Earle's Salzen und 20 mM Hepes-Puffer (Flow Labs), dem 1 mM L-Glutamin, 0,5 mM Na-Pyruvat, 20 mM Na-Laktat und 10 % hitzeinaktiviertes FKS (Gibco) zugesetzt worden waren.

Weiterhin verwendeten sie McCoy's 5 A Medium, setzten dem Kulturmedium 1 mM db-cAMP (Sigma) zu.

Die Menge zugesetzten Na-Bicarbonats (5-15 mM) richtete sich nach der CO₂-Konzentration des Gasgemisches.

Weitere Zusätze, z.B. (³H) Thymidin oder Colcemid wurden für spezielle Fragestellungen eingesetzt.

DONOVAN et al. (1986) kultivierten PKs auf Monolayer-Zellkulturen (STO-Zellen), die routinemäßig in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DME) mit 10 % FKS, 4 mM Glutamin sowie Penicillin und Streptomycin kultiviert worden waren. Kurz vor ihrer Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsinieren gewonnen (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS), gewaschen und mit 6000 rad bestrahlt (Caesium-Gamma). Die bestrahlten STO-Zellen wurden in DME auf 5 x 10⁴ Zellen pro ml eingestellt und in die oben beschriebenen Kulturgefäße überführt. 24-48 Stunden später wurden die PK-Zellsuspensionen hinzugesetzt.

DE FELICI und McLAREN (1983) verwendeten routinemäßig M 199 mit dem Zusatz von 1 mM L-Glutamin, 0,5 mM Na-Pyruvat und 20 mM Na-Laktat. Außerdem kamen die folgenden Medien zum Einsatz: DMEM mit 4,5 g/l Glucose, DMEM mit 0,1 g/l Na-Pyruvat, RPMI 1640 (Gibco), NCTC 135 (Gibco), Ham's F 10 (Flow) und MCDB 104 (Flow). Außer RPMI 1640 und NCTC 135 enthielten alle Medien 20 - 25 mM Hepes-Puffer.

Routinemäßig wurden alle Medien mit 10 % FKS (Gibco) ergänzt;

die Konzentration wurde teilweise auf 20 bzw. 50 % gesteigert.

Außerdem kamen NCS und RS zum Einsatz oder das Serum wurde durch BSA (4 mg/ml) ersetzt.

Die Volumina der Medien wurden dem jeweils verwendeten Kulturgefäß angepaßt: Petrischale: 3 ml bzw. 20-100 µl in Tropfen unter Paraffinöl; Mikrotest-Platte: 0,2 ml pro Vertiefung.

2.2.4.3 Gasgemische

Die in vitro Kultur wurde in Luft (Zugabe von 5 mM Na-Bicarbonat) oder in 5 % CO₂ in Luft (Zugabe von 15 mM Na-Bicarbonat) durchgeführt (WABIK-SLIZ und McLAREN, 1984; DE FELICI und McLAREN, 1983).

2.2.4.4 Temperaturen

WABIK-SLIZ und McLAREN (1984) kultivierten bei Raumtemperatur oder bei 37⁰ C. Raumtemperatur (24-26⁰ C), 30⁰ C und 37⁰ C setzten DE FELICI und McLAREN (1983) ein.

2.2.5 Beurteilung der Zellen

WABIK-SLIZ und McLAREN (1984) und DE FELICI und McLAREN (1983) überprüften die Lebensfähigkeit der Zellen anhand einer lebend-/tot- Färbung mit dem Farbstoff Erythrosin B (PHILLIPS, 1973).

DONOVAN et al. (1986) bewerteten den Nachweis der AP-Aktivität als Kriterium für die Annahme, daß überlebende Zellen vorlagen.

Fragestellungen, die über eine Aussage über die Lebensfähigkeit der PKs hinausgingen (^3H -Thymidin-Aufnahme, Antikörper-Markierung), wurden mit speziellen Verfahren der Autoradiographie bzw. Fluoreszenzmikroskopie untersucht (DONOVAN et al., 1986; WABIK-SLIZ und McLAREN, 1984).

2.2.6 Ergebnisse der in vitro Kultur

2.2.6.1 Überlebensrate

Ohne Einzelheiten (z. B. Prozentsatz lebensfähiger Zellen) zu erwähnen, berichtet HEATH (1978 a) von einer Kulturdauer von mindestens einer Woche, während der die Anzahl lebensfähiger PKs abnahm, Zellen beiderlei Geschlechts und jeden Stadiums keine Teilungen aufwiesen und keine Aufnahme von ^3H -Thymidin in die DNA erfolgte.

Die Verwendung sogenannter "feeder layer", die aus Mitomycin-behandelten Fibroblasten oder somatischem Gonadenmaterial hergestellt worden waren, konnte ebenfalls keine Zellteilungen induzieren, verringerte aber die Rate atretischer PKs.

Hinsichtlich der Wiederfindungsrate der Zellen sprechen DONOVAN et al., (1986) bei einer sechs Tage dauernden Kulturperiode von 10,5 dpc-PKs von einer Zunahme AP-positiver Zellen vom ersten zum zweiten Tag. Von diesem Zeitpunkt nahm die Zahl der auf diese Weise markierten Zellen kontinuierlich ab, wobei unklar ist, ob dies auf eine Reduzierung der PKs zurückzuführen ist oder auf die Unmöglichkeit, sie darzustellen.

Die Gesamtpopulation der Pks nahm ab, obwohl Anhaltspunkte für Zellteilungen vorlagen (nachgewiesener Eintritt in die Mitose nach drei Tagen in vitro Kultur).

WABIK-SLIZ und McLAREN (1984) prüften die Vitalität von 12,5

dpc-PKs in 24-Stunden-Intervallen. Auch hier nahm der Anteil überlebender Zellen spätestens ab dem zweiten Tag kontinuierlich ab, wobei die Überlebensrate weiblicher PKs immer höher lag (am sechsten Tag der in vitro Kultur noch bei ca. 30%) als die der männlichen Zellen (unter 10 % am 6. Tag).

DE FELICI und McLAREN (1983) untersuchten zunächst die Lebensfähigkeit der PKs einzelner Entwicklungsstadien (11,5 bis 15,5 dpc) nach 24stündiger in vitro Kultur in M 199 bei 37⁰ C und 5 % CO₂. Bei 11,5 und 12,5 dpc-PKs lagen unbefriedigende Ergebnisse vor (bis ca. 20 % überlebende), während die Überlebensraten älterer Stadien bei 40 bis 50 % lagen.

Nach drei Tagen ergab sich ein ähnliches Bild, wobei aber die PKs der frühen Stadien noch schlechtere Ergebnisse lieferten (ca. 10% überlebende). Eine Ausnahme war bei der Kultur in Raumtemperatur zu verzeichnen: hier überlebten auch die 11,5 bzw. 12,5 dpc-PKs zu mehr als 50 %, die Überlebensrate der älteren Zellen war höher (60 bis 80 %) und die Differenz zwischen den Überlebensraten weiblicher und männlicher Zellen war entweder nicht gegeben oder unauffällig.

Weibliche PKs ab dem Alter 13,5 dpc hatten bei Verwendung von M 199 bei 37⁰ C sowohl in Luft als auch in 5 % CO₂ in Luft ein durchweg besseres Kulturverhalten als männliche gezeigt, die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Bei Raumtemperatur konnten die Zellen bei einer Gesamtüberlebensrate von mehr als 60 % für wenigstens eine Woche kultiviert werden.

Die niedrige Überlebensrate der 11,5 und 12,5 dpc-PKs führen die Autoren auf spezielle metabolische Besonderheiten jener Stadien zurück, denen die Verwendung von M 199 nicht gerecht wird. Um diesen Mangel zu beheben, wurden die verschiedensten Medien und Zusätze (siehe oben) variiert, ohne jedoch die Lebensfähigkeit dieser frühen Zellen positiv beeinflussen zu können.

2.2.6.2 Mitoseaktivität

Die Untersuchungen auf mitotische Aktivität der PKs zeigte zu Beginn der Kultur die höchste Aktivität bei PKs von 12,5 dpc-Feten (35 - 40 % der Zellen in der Metaphase nach fünfständiger Colchicin-Inkubation). Nach 24ständiger Kultur wurde die höchste Aktivität bei den 11,5 dpc-PKs festgestellt, während 12,5 und 13,5 dpc-Zellen auch nach 3 bis 4 Tagen der in vitro Kultur noch Mitosen zeigten. Dies läßt vermuten, daß die mitotische Arretierung in vitro geringfügig verzögert eintritt.

Die bei Raumtemperatur für 5 bis 6 Tage kultivierten 12,5 dpc-PKs zeigten nur während der ersten 24 Stunden mitotische Aktivität.

2.2.6.3 Meiose

In Meiose befindliche Zellen fanden DE FELICI und McLAREN (1983) bei weiblichen PKs ab 13,5 dpc (Leptotän / Zygotän). Ein Fortschreiten der Teilungsvorgänge wurde bis zum dritten Tag der in vitro Kultur beobachtet (vorwiegend Zygotän / Pachytän). Eine ähnliche Entwicklung wurde bei 14,5 bis 16,5 Tage alten Zellen gefunden, wenn auch die Meioserate in vitro geringer war als in vivo.

Bei der Kultur weiblicher PKs unter 30⁰ C wurden lediglich die bereits zu Beginn der Kultur vorliegenden Bilder der Meiose über 2 bis 3 Tage beobachtet; ein Fortschreiten der Meiose fand nicht statt.

Meiotische Prophase zeigten die Zellkerne männlicher PKs niemals, gleichgültig unter welchen Bedingungen sie kultiviert worden waren.

2.2.6.4 Morphologie und Motilität

DONOVAN et al. (1986) untersuchten das unterschiedliche Verhalten des "migratory-" sowie des "postmigratory-" Typs der Mäuse-PKs in vitro. Zellen, die aus Feten früher Entwicklungsstadien (10,5 dpc) gewonnen wurden und somit den "migratory-" Typ repräsentierten, zeigten sowohl hinsichtlich morphologischer Merkmale (Pseudopodien, Filopodien, uroids, retraction fibers) als auch ihres Verhaltens (aktive, vermutlich invasive Beweglichkeit, Ausbreitung auf dem Kultursubstrat) Charakteristika motiler Zellen.

PKs der späteren Stadien (13,5 dpc) zeigten diese Merkmale nicht mehr.

2.2.6.5 Zusammenfassung

DE FELICI und McLAREN (1983) konnten die besonders unbefriedigenden Ergebnisse der in vitro Kultur von Mäuse-PKs der frühen Stadien (11,5 und 12,5 dpc) nicht erklären.

Die höheren Überlebensraten bei 13,5 dpc-PKs könnten ihren Ursprung in einer durch die allmähliche Beendigung der Zellteilungen erhöhten Widerstandskraft der PKs gegenüber äußeren Einflüssen haben. Dieses Stadium fällt mit dem Abschluß der Gonadenbesiedlung in vivo zusammen und könnte somit ein Anhaltspunkt für veränderte metabolische Gegebenheiten sein.

DE FELICI und McLAREN (1983) vermuten, daß die Kulturbedingungen in vitro auch für die PKs älterer Feten (13,5 und mehr dpc) noch suboptimal waren. Diese Zellen sind zwar mehrheitlich lebensfähig, proliferieren und die weiblichen treten in die Meiose ein, aber die Degenerationsrate steigt schnell und erheblich an.

Wurden Reste der Gonaden im Kulturgefäß belassen, fanden DE FELICI und McLAREN (1983) die PKs immer in engem Kontakt zu diesem verbliebenen somatischen Zellmaterial. Diese Beobachtung veranlaßte sie, PKs auf "feeder layer" aus Zellmaterial fetaler Gonaden oder Mesonephren auszusäen. Die Überlebensdauer konnte auf "viele" Tage ausgedehnt werden.

DE FELICI und McLAREN (1983) stellen fest, daß PKs in ihrer physiologischen Umgebung niemals als isoliertes Gewebe existieren, sondern immer engen Kontakt zu anderen Zellen haben, von denen sie möglicherweise ihrem Stoffwechsel dienliche Substanzen sowie ihre Entwicklung beeinflussende Signale erhalten.

Für das Überleben der PKs in vitro könnten diese Stoffe durchaus einen kritischen Faktor darstellen.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 Tiermaterial

3.1.1 Rinder

Zur Gewinnung von Rinderfeten wurde auf zufällig am Schlachthof München anfallendes Tiermaterial zurückgegriffen. Bei den Spendertieren handelte es sich zum überwiegenden Anteil um Tiere der Rasse Deutsches Fleckvieh.

Die Herkunft der Tiere und eine eventuelle Vorbehandlung waren nicht bekannt.

3.1.2 Schweine

Es standen Schlachtschweine der Deutschen Landrasse in bekannten Gestationsstadien zur Verfügung.

Die Tiere wurden in Stallungen des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim der LMU München gehalten.

3.1.3 Kaninchen

Hasenkaninchen, Kalifornier, ZIKA^R - Hybridkaninchen (Basiszucht: Dr. E. Zimmermann) und Kreuzungstiere aus institutseigener Nachzucht wurden rechtzeitig vor der Schlachtung kontrolliert angepaart bzw. künstlich besamt. Dadurch war das exakte Entwicklungsstadium der Feten bekannt.

Die Kaninchen waren zum Teil in einem Versuchsstall untergebracht, in dem ein 14-stündiger Licht- und 10-stündiger Dunkelrhythmus über ein Lichtprogramm vorgegeben war und eine Temperatur von 17° C herrschte. Andere Tiere waren in einem Außenstall untergebracht, dessen Klima- und Lichtverhältnisse den natürlichen Gegebenheiten entsprachen.

3.1.4 Mäuse

Für die Versuche standen Muttertiere der Stämme NMRI (Pop), C57 black (Institut), C57 black WIGA sowie Böcke der Stämme NMRI (Pop) und C57 black zur Verfügung.

Die Tiere wurden in einem Versuchsstall gehalten, in dem eine Temperatur von 18 - 21⁰ C herrschte. Ein jeweils 12-stündiger Tag- und Nachtrhythmus der Beleuchtung wurde über ein Lichtprogramm gesteuert.

Die Trächtigkeiten wurden durch natürliche Anpaarungen erzielt, wobei jedem Bock zwei Weibchen zugeteilt worden waren.

Lag bei der täglichen Vaginalplug-Kontrolle ein positiver Befund vor, wurde das betreffende Weibchen vom Bock getrennt und das jeweilige Datum als "Tag 0" der Gravidität notiert.

3.2 Gewinnung der Feten

3.2.1 Rinder

Bei vorliegender Gravidität eines geschlachteten Tieres wurde der Fetus vom Schlachtpersonal des Schlachthofes München entnommen. Bedingt durch unterschiedliche Techniken der Schlachtkörperzerteilung sowie die erheblichen Größenunterschiede der Feten war es nicht immer möglich, das Material unter standardisierten Bedingungen zu gewinnen.

Nach Möglichkeit wurde der Uterus unversehrt entnommen und der Fetus anschließend direkt in das Transportmedium überführt. Wenn es die Größe des Feten zuließ, konnten die Eihäute dabei intakt bleiben, was die Gefahr einer mikrobiellen Kontamination erheblich reduzierte.

Als Transportmedium kamen M2 (selbst hergestellt) und PBS (Fa. Flow Labs) zum Einsatz. Die zu Beginn der Versuche praktizierte Kühlung des Transportmediums mittels Eiswassers

wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen unterlassen, weil diese Methode keinen nennenswerten Vorteil gegenüber dem Transport bei Umgebungstemperatur brachte.

Ein erheblicher Zeitverlust zwischen Tötung des Muttertieres und Beginn der Präparation im Labor war durch den Tätigkeitsablauf am Schlachtband und den Transport zum Institut nicht zu umgehen.

3.2.2 Schweine

Gravide Schlachtschweine wurden zum gewünschten Gestationsstadium geschlachtet. Sobald als möglich nach der Tötung wurden die Uteri entnommen und sofort eröffnet. Die Feten wurden in Transportmedium (M2 oder PBS) überführt, welches ebenfalls bei den ersten Versuchsdurchgängen gekühlt worden war, später aber bei Umgebungstemperatur gehalten wurde.

Da zwischen dem Eintritt des Todes des Muttertieres und der Entnahme der Uteri durch die notwendigen Prozeduren der Schlachtkörperzerlegung eine erste zeitliche Verzögerung eintrat und eine zweite durch den Transport der Feten zum Labor, konnte die Präparation auch bei dieser Tierart erst ziemlich spät einsetzen.

3.2.3 Kaninchen

Trächtige Kaninchen wurden im Institut nach Betäubung durch Entblutung getötet. Die Uteri wurden sofort entnommen und die Feten in PBS überführt. Die Präparation konnte somit im kürzestmöglichen Zeitabstand zur Tötung der Muttertiere beginnen.

3.2.4 Mäuse

Zum beabsichtigten Gestationsstadium wurden die graviden Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und in Rückenlage verbracht. Nach Desinfektion der Haut wurde die Bauchhöhle geöffnet und der Uterus entnommen. Die gewonnenen Feten wurden in M2 oder PBS aufgefangen. Bei dieser Tierart war somit der Beginn der Präparation innerhalb weniger Minuten nach der Tötung des Muttertieres möglich.

3.3 Präparation der Gonadenanlagen und Freisetzen der primordialen Keimzellen

Während die besonderen Umstände des Schlacht- bzw. Tötungsprozesses bei den einzelnen Tierarten geringfügige Unterschiede in der Methode der Fetengewinnung bedingten, konnten die anschließende Präparation der Gonadenanlagen, im Zuge derer eine Geschlechtsbestimmung der Feten erfolgte, und das Freisetzen der PKs bei allen vier bearbeiteten Spezies einem einheitlichen Schema folgen.

3.3.1 Gewinnung der Gonadenanlagen

Die Präparation der Feten bzw. der PKs erfolgte unter den Stereomikroskopen SV 8 (Fa. Zeiss) und M 8 (Fa. Wild).

Der Fetus wurde dem Transportmedium entnommen und in ein seiner Größe entsprechendes Gefäß umgesetzt, das mit frischem Medium befüllt worden war. Hierbei wurden Petrischalen aus Plastik (Fa. Nunc) verschiedener Größe oder gläserne Mikroskopiernäpfe verwendet. Da das Alter der Rinderfeten nicht bekannt war, wurde die Scheitel-Steiß-Länge (SSL) gemessen, um über dieses Maß eine Altersschätzung vornehmen zu können. Kaudal der Vordergliedmaßen wurde der Fetus quergeteilt. Dies

geschah je nach Entwicklungsstadium mittels einer kleinen Präparierschere oder eines selbstgefertigten Instrumentes, das aus einem Nadelhalter und einer darin eingespannten chirurgischen Nadel der Größe 6 mit Dreikantprofil bestand. Der Rumpf des Feten wurde mit einer Mikropinzette mit geraden Spitzen (0,15 mm) (Fa. Aesculap) fixiert.

Nach ventromedianer Inzision der Bauchwand wurden Leber und Darmkonvolut in kranialer Richtung verschoben und abpräpariert, was ebenfalls unter Zuhilfenahme der zuvor erwähnten Instrumente erfolgte.

Die nun sichtbar gewordenen Mesonephren wurden mitsamt den an ihrer Medialkontur befindlichen Gonadenanlagen vorsichtig herauspräpariert und in ein mit Frischmedium befülltes Kulturgefäß überführt. Hierbei wurde wiederum anhand des Entwicklungsstadiums des Feten über die Auswahl der Instrumente entschieden.

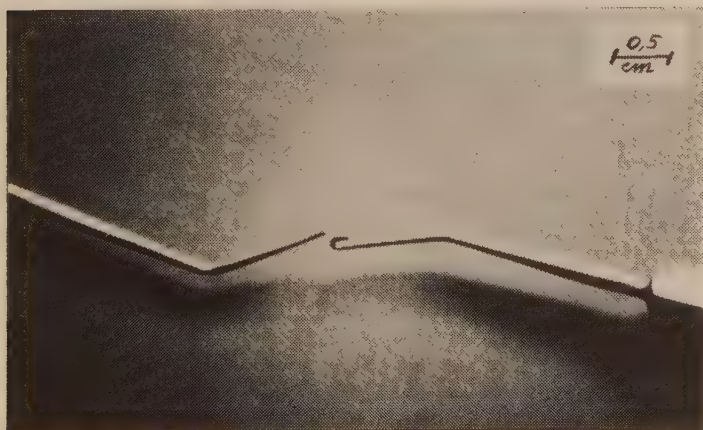


Abbildung 4: Tränenwegsonde, Modell Gießen, und Irishäkchen nach Weber (beide Fa. Storz).

Unter Verwendung eines weiteren selbstgefertigten Instrumentes, das jedoch mit einer kleineren Nadel der Größe 3 versehen war, und zweier Instrumente aus der Ophthalmologie, die Abb. 4 zeigt, wurden anschließend die Gonadenanlagen behutsam von den Mesonephren getrennt und erneut in Frischmedium verbracht.

Abb. 5 zeigt schematisch den beschriebenen Ablauf der Gonadenpräparation.

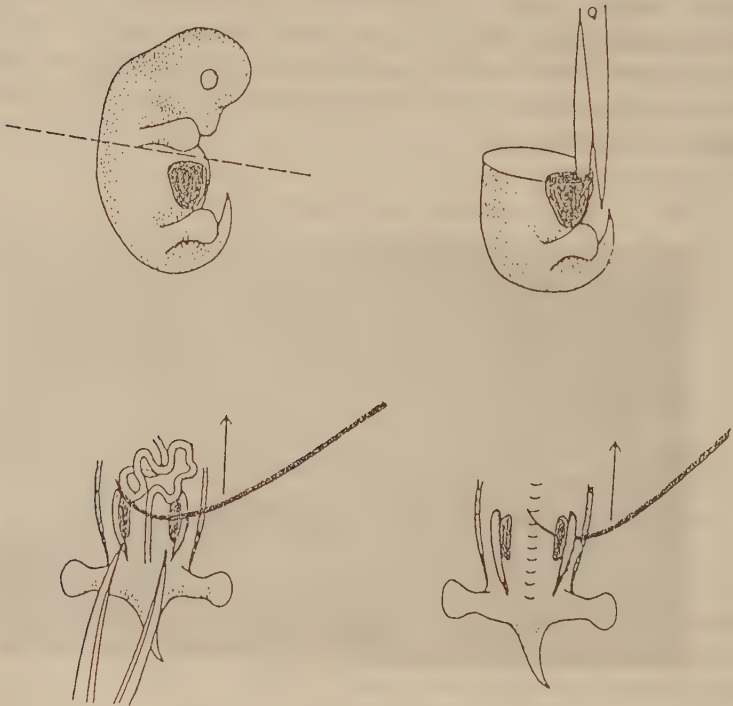


Abbildung 5: Schema der Präparation der Gonadenanlagen und Mesonephren. Erläuterung im Text. Nach HOGAN et al. (1986).

3.3.2 Geschlechtsbestimmung

Sofern es der Entwicklungszustand der Feten und somit der Gonadenanlagen zuließ, wurde das Geschlecht anhand morphologischer Kriterien bestimmt.

Hierzu zählen vor allem Oberflächenvaskularisierung und Bildung der Tunica albuginea beim sich entwickelnden Hoden und Gesamterscheinungsbild des Organs. Während weiblich determinierte Gonadenanlagen lichtmikroskopisch eher diffus erscheinen, erkennt man beim sich entwickelnden Hoden im Zuge der Hodenstrangbildung eine streifige Struktur des Organs. Dieses Bild ist in Abb. 6 graphisch wiedergegeben.



Abbildung 6: Schema der sich differenzierenden männlichen und weiblichen Keimdrüsen. Nach SCHNORR (1985).

Keimdrüsen 15 Tage alter Mäusefeten zeigen die erwähnten Unterscheidungsmerkmale sehr deutlich (Abb. 7), wobei hier auch ein erheblicher Größenunterschied auffällt.

In Versuchsansätzen, für die mehrere Feten desselben Muttertieres vorlagen, wurde somit folgende Gruppenbildung ermöglicht: weiblich, männlich und ohne Geschlechtertrennung (= gepoolt).



Abbildung 7: Männliche (links) und weibliche (rechts) Gonaden von Mäusefeten, 15 dpc.

3.3.3 Gewinnung der primordialen Keimzellen

Da die rein mechanische Behandlung der Gonadenanlagen eine zu geringe Ausbeute erwarten ließ und bei Anwendung enzymatischer Reagenzien (z.B. Collagenase, Trypsin / EDTA) mit einer gravierenden Schädigung des Zellmaterials zu rechnen war, wurden diese Methoden nur vereinzelt angewendet.

Im überwiegenden Anteil aller Versuche wurden die Gonadenanlagen in einer EDTA-Lösung inkubiert, deren Konzentration zwischen 0,02% und 0,5% lag. Die Dauer der Einwirkung variierte zwischen 10 und 20 Minuten.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Gonadenanlagen in ein dem weiteren Versuchsablauf entsprechendes Medium umgesetzt (PBS, Kulturmedium oder Tiefgefriermedium).

Die einzelnen Organe wurden mit einer Mikropinzette fixiert

und mit einer sehr feinen Kanüle (32 G, Fa. Becton & Dickinson) 20 - 30mal punktiert. Hierdurch wurden die PKs freigesetzt und konnten mit einer Mikropipette, die über einen Schlauch mit einem Mundstück verbunden war, aufgenommen werden. Zur Herstellung der Mikropipetten wurden heparinisierte Mikrohämatokrit-Röhrchen (Fa. Brand) über der Gasflamme auf einen Innendurchmesser von ca. 20 μm ausgezogen.

3.4 Beurteilung der Zellen

Unmittelbar im Anschluß an die Gewinnung der PKs wurde das Material lichtmikroskopisch beurteilt und über seine Verwendung für weitere Untersuchungen entschieden.

3.4.1 Visueller Gesamteindruck

Das nach der Punktion am Boden des Kulturgefäßes vorliegende Zellmaterial wurde überprüft auf

- I. Vorliegen von PKs und, wenn positiv, quantitative Einschätzung der Zellausbeute,
- II. Maß der Kontamination mit somatischen Zellen und
- III. Grad der Verklumpung der PKs.

3.4.2 Nachweis primordialer Keimzellen

Um sicherzustellen, daß es sich bei den als "PKs" angesprochenen Zellen tatsächlich um primordiale Keimzellen handelte, wurde, in Zellen der Maus, des Rindes und des Schweines die Alkalische Phosphatase (AP) nachgewiesen. Hierzu diente ein Testkit für den AP-Nachweis in humanen

Granulozyten (Fa. Sigma).

Ein Tropfen der Zellsuspension wurde möglichst flach auf einen Objektträger gesetzt und die beginnende Trocknung, erkennbar an der Bildung einer grau-weißlichen Randzone des Tropfens, abgewartet. Die für den Blutausstrich empfohlene Lufttrocknung ist nicht anwendbar, da die Zellen durch das Auskristallisieren des Mediums zerstört werden.

Das Material wurde für 30 Sekunden in einer im Kühlschrank für einige Wochen haltbaren Lösung (Aceton, citratgepuffert, 60 %) fixiert, danach ca. 20 Sekunden lang mit Wasser abgespült und anschließend für 15 Minuten luftgetrocknet.

Die Färbelösung wurde jeweils frisch hergestellt aus 48 ml Aqua dest., 1 Kapsel Fast Blue RR Salt und 2 ml Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution.

Der Objektträger wurde mit der Färbelösung für ca. 30 Minuten überschichtet, danach vorsichtig mit Aqua dest. gespült und luftgetrocknet.

Die mikroskopische Beurteilung der Präparate konnte sofort im Anschluß an deren Herstellung durchgeführt werden.

Ausschließlich anhand morphologischer Kriterien wurden die PKs vom Kaninchen in Anlehnung an die bei den anderen Spezies gefundenen Merkmale als solche identifiziert.

3.4.3 Vitalitätsprüfung

Sofern es der geplante Versuchsablauf zuließ und keine nachteiligen Folgen für das restliche Zellmaterial zu erwarten waren, wurde sowohl in unmittelbarem Anschluß an die Freisetzung der PKs als auch zu späteren Zeitpunkten im Verlauf des jeweiligen Versuches eine Vitalitätsprüfung vorgenommen.

Routinemäßig wurde die einfache Methode der Vitalfärbung mit

bestimmten Farbstoffen angewendet, die von lebenden Zellen nicht aufgenommen werden, z. B. Trypanblau (LINDL und BAUER, 1987) oder Erythrosin B (PHILLIPS, 1973). Die aufwendigere, von BAUNACK und KELLERMANN (1986) beschriebene Anfärbung der PKs mit Fluoresceinisothiocyanat, die das Entwicklungsschicksal der PKs im Zuge der Erstellung von Aggregationschimären bei der Maus dokumentieren sollten, wurde nur sporadisch eingesetzt.

Zur Durchführung der Vitalfärbungen wurde eine Erythrosin B-Stammlösung hergestellt, deren Rezeptur aus Tab. 4 hervorgeht.

Tab.4 Erythrosin B-Stammlösung zur Vitalfärbung
(PHILLIPS, 1973)

Aqua dest.	95	ml
Erythrosin B	0,4	g
NaCl	0,81	g
KH ₃ PO ₄	0,06	g
Methyl-p-hydroxybenzoat	0,05	g

Die Lösung wird zum Kochen gebracht, nach Abkühlung auf pH 7,2-7,3 mit 1 N NaOH eingestellt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

0,1 ml dieser Stammlösung und 1 ml HBSS oder PBS wurden für den aktuellen Bedarf gemischt und ein Tropfen der gebrauchsfertigen Lösung mittels einer Pasteurpipette in die Vertiefung eines Objektträgers gesetzt.

Ca. 30 µl der mittels einer Mikropipette aufgenommenen Zellsuspension wurden in diesen Tropfen überführt. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde für eine gute Durchmischung gesorgt. Der Farbstoff konnte vier Minuten lang einwirken. Nach dieser Zeit wurden die Zellen wiederum mit einer Mikropipette aufgenommen und in die zweite Vertiefung des

Objektträgers gesetzt. Sofort wurde der prozentuale Anteil derjenigen Zellen ermittelt, die keinen Farbstoff aufgenommen hatten und somit als vital angesehen wurden.

Der Grenzwert vitaler Zellen, bei dessen Unterschreiten i.d. R. keine weiteren Untersuchungen vorgenommen wurden, lag bei 30 %.

3.5 In vitro Kultur

3.5.1 Kulturgefäße

Für die in vitro Kultur kamen vorwiegend Mikroskopiernäpfe aus Glas zur Verwendung, zumeist dieselben, in denen die PKs gewonnen worden waren. Zur Inkubation wurden die Näpfchen in Petrischalen mit dem Durchmesser 10 cm (Fa. Nunc) gesetzt, was einerseits die Identifizierung der Behälter durch Beschriftung erleichterte und andererseits die Gefahr mikrobieller Kontamination reduzierte.

Petrischalen für die Zellkultur (Fa. Nunc) mit dem Durchmesser 35 mm und Objektträger-Kulturkammern (Fa. Nunc) wurden ebenfalls verwendet.

3.5.2 Kulturmedien

Als HEPES-gepufferte Medien wurden M2 und TCM 199 (mit Earle's Salzen, 20 mM Hepes, ohne Bicarbonat; Fa. Flow Labs.) eingesetzt und MEM (nach Eagle, mit Earle's Salzen; Fa. Gibco) als Bicarbonat-gepuffertes Medium.

Den Kulturmedien wurde fetales Kälberserum (MEM und TCM 199; 10-20%; Fa. Biochrom) bzw. bovines Serumalbumin (M2; 4 mg/ml; Fa. Serva) zugesetzt.

3.5.3 Kulturbedingungen

Kulturansätze mit den HEPES-gepufferten Medien (M2 und TCM 199) wurden in Luft inkubiert, solche mit MEM (Bicarbonat-Puffer) in 5% CO₂ in Luft.

Da bei Verwendung von M2 oder TCM 199 die Kultivierung in Luft möglich war, wurden einige Ansätze unter Raumbedingungen durchgeführt, d. h. bei einer Temperatur von ca. 22° C, andere im Inkubator mit 37° C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit (rL).

Die in vitro Kultur mit MEM wurde stets im Inkubator (37° C, 95% rL) durchgeführt.

3.6 Kryokonservierung

3.6.1 Tiefgefriergefäße

Für das Einfrieren und Lagern der PKs wurden strahlensterilisierte Kryoröhrchen aus Polypropylen mit dem Fassungsvermögen von 1 bzw. 1,8 ml (Fa. Nunc) verwendet.

Die für die Kryokonservierung von Embryonen bewährten Mini-Pailletten (Fa. Minitüb) waren wegen ihres günstigeren Fassungsvermögens erprobt worden, hatten sich jedoch als unbrauchbar erwiesen, da eine Adhäsion der PKs an der Innenwand der Pailletten stattfand und die Zellen somit verloren waren.

3.6.2 Tiefgefriermedien

Als Basismedien wurden zunächst M2, später ausschließlich MEM und TCM 199 verwendet.

FKS wurde in der Konzentration von 20% zu MEM und TCM 199 gegeben, BSA zu M2 (4 mg/ml).

Als Kryoprotektivum wurde Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Sigma) allen Medien in der Konzentration von 10% zugesetzt.

3.6.3 Prozeß des Tiefgefrierens

3.6.3.1 Elektronisch gesteuerte Methode

Weil der optimale Verlauf der Temperaturabsenkung für viele unterschiedliche Zellpopulationen sehr verschiedenartig ist und sich im Rahmen von $2000^{\circ} \text{ C min}^{-1}$ für Erythrozyten bis etwa $0,4^{\circ} \text{ C min}^{-1}$ für Embryonen bewegt (MEIER, 1983), ist für die Erprobung, Dokumentation und Reproduzierbarkeit diverser Tiefgefrierprogramme ein elektronisch gesteuertes Gerät von Nutzen.

Ein solches Gerät, in dem die Kälteübertragung über ein Alkoholbad (Propanol) erfolgt (BioCool, Fa. FTS), wurde mit einem für das Einfrieren von Mäuse- und Rinderembryonen geeigneten Programm eingesetzt.

Nachdem die Kryoröhrchen sicher verschlossen worden waren, wurden sie auf Halteschienen aus Aluminium (Fa. Cryoson) geklemmt und in das Propanolbad getaucht. Ein am Boden des Propanolbehälters befindlicher Rührer bewirkte eine gleichmäßige Temperaturverteilung.

Die Abkühlungsrate lag im Bereich von $+20^{\circ} \text{ C}$ bis -6° C bei $1,5^{\circ} \text{ C pro Minute}$, im Bereich zwischen -6° C und -32° C bei $0,3^{\circ} \text{ C pro Minute}$ und im Bereich -32° C bis -40° C bei $0,1^{\circ} \text{ C pro Minute}$.

Über diese Programmsteuerung wurde eine Abkühlung auf -32° C in etwa 87 Minuten und auf -40° C in etwa 184 Minuten erreicht.

Im Temperaturbereich zwischen -32° C und -40° C wurden die Kryoröhrchen dem Alkoholbad entnommen und in flüssigen Stickstoff (Liquid Nitrogen, LN_2 ; Flüssigphase, -196° C) zur permanenten Lagerung verbracht.

3.6.3.2 Konventionelle Methode

Um zu überprüfen, ob es möglich ist, PKs unter Anwendung der herkömmlichen Methode einzufrieren, wurde das Zellmaterial teilweise für 1-3 Stunden im Kühlschrank (ca. $+5^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt und dann in einen Tiefgefrierschrank (-70°C) verbracht. Die Kryoröhrchen wurden vor Beginn dieser Prozedur in einem geeigneten Kunststoff-Ständer fixiert und in diesem in eine Styroporbox der Wandstärke 2 cm gestellt.

Diese Isolierung sollte für eine relativ gleichmäßige Abkühlung des Tiefgefriermediums sorgen.

Nach Ablauf von 24 Stunden wurde ein Teil der Proben in flüssigen Stickstoff umgelagert, der andere Teil blieb bis zum Auftauen bei -70°C gelagert.

3.6.4 Auftauen des Zellmaterials

Das Auftauen der PKs erfolgte im Wasserbad bei $+37^{\circ}\text{C}$ und nahm ca. 2 Minuten in Anspruch, wobei geringfügige Abweichungen durch unterschiedliche Volumina des Tiefgefriermediums gegeben waren.

Beim Auftauen in LN_2 gelagerten Materials kam es häufig vor, daß aufgrund der plötzlichen Volumenausdehnung der über dem Tiefgefriermedium befindlichen Luft der Dichtungsring des Kryoröhrchens gesprengt wurde. Hierbei mußte darauf geachtet werden, daß kein Wasser in das Röhrchen eindringen konnte. Die Verwendung eines Cryo-Swim-Racks (Fa. ratiolab), in dem die Kryoröhrchen fixiert werden konnten, erwies sich hierbei als hilfreich.

3.6.5 Weitere Behandlung

Im Anschluß an das Auftauen mußte das Zellmaterial dem zytotoxischen Einfluß des DMSO entzogen werden; hierzu wurde

nach zwei unterschiedlichen Methoden verfahren:

I. Die Kryoröhrchen wurden sofort zentrifugiert (10 Minuten bei 200 g), das Tiefgefriermedium anschließend dekantiert, die Röhrchen mit frischem Medium aufgefüllt und das Zellmaterial resuspendiert.

II. Das die aufgetauten Zellen enthaltende Tiefgefriermedium wurde mit etwa demselben Volumen Frischmediums verdünnt, durch vorsichtiges Pipettieren durchmischt und für ca. 3 Stunden im Inkubator kultiviert, wobei je nach Art des eingesetzten Basismediums eine evtl. CO₂-Begasung vorgenommen wurde.

Anschließend wurde das Material für 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert, das Mediengemisch dekantiert und die Zellen in Frischmedium resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde zur Vitalitätsprüfung bzw. weiteren in vitro Kultur in gläserne Mikroskopiernäpfe überführt.

4. ERGEBNISSE

Zur Untersuchung vitaler primordialier Keimzellen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Rinder-, Schweine-, Kaninchen- und Mäusefeten folgender Anzahl, Geschlechtszugehörigkeit und Altersstufen herangezogen werden:

Beim Rind wurden aus 57 Spendertieren 57 Feten gewonnen, deren Scheitel-Steiß-Länge zwischen 12 und 140 mm lag. Davon waren 12 weiblich, 23 männlich und 22 Feten mit unbekanntem Geschlecht.

Aus 25 trächtigen Schlachtschweinen wurden 155 Feten gewonnen. Davon waren 15 weiblich, 13 männlich und 127 unbekannten Geschlechts. Die Schlachtungen erfolgten zwischen dem 20. und 57. Tag der Gravidität.

Beim Kaninchen wurden 32 Spendertiere zwischen dem 16. und 22. Tag der Gravidität geschlachtet. Aus ihnen konnten 297 Feten gewonnen werden, davon 137 weibliche, 136 männliche und 24 unbekannten Geschlechts.

Aus 13 graviden Mäusen wurden nach deren Tötung 109 Feten gewonnen, deren Entwicklungsstadium zwischen 13 und 15 dpc lag. 26 Feten waren weiblich, 23 waren männlich und bei 60 Feten war das Geschlecht unbekannt.

Tab. 5 zeigt die Daten über die gewonnenen Feten.

Bedingt durch den jeweiligen Versuchsansatz wurde eine Geschlechtsdiagnose nicht in allen Fällen durchgeführt, in denen sie möglich gewesen wäre. Dies gilt vor allem für die Mäuse-PKs, deren Geschlechtszugehörigkeit für die vorbereitenden Versuche zur Kryokonservierung der Nutztier-PKs von untergeordneter Bedeutung waren.

Tab. 5: Anzahl, Geschlecht und Alter der gewonnenen Feten bei den untersuchten Tierarten

	Rind	Schwein	Kanin.	Maus
Spendertiere	57	25	32	13
Feten insges.	57	155	297	109
Feten weiblich	12	15	137	26
Feten männlich	23	13	136	23
Feten mit unbek. Geschl.	22	127	24	60
SSL der Feten [mm]	12-140	6-90	13-54	o.A.
Alter der Feten	4-12 Wo*	20-57 ⁺	16-22 ⁺	13-15 ⁺

*= geschätzt nach SCHNORR, 1985

⁺= dpc; Tag 0= Tag der Belegung/Besamung bzw. pos. Vaginalplug

4.1 Gewinnung primordialer Keimzellen

4.1.1 Gewinnung der Gonaden - Alter der Feten

Hinsichtlich der beschriebenen Methode der Gonadenpräparation stellten sich für alle drei untersuchten Nutztierspezies unter Berücksichtigung des Alters der Feten folgende Vor- und Nachteile heraus:

I. Frühe Stadien:

a) Aufgrund der topographisch noch sehr engen Lagebeziehung zwischen sich entwickelnder Gonadenanlage und Mesonephros und der sehr fragilen Konsistenz des Gonadengewebes ist die Präparation der Organe (bzw. Organanlagen) schwierig.

b) Wegen der noch nicht abgeschlossenen Besiedelung der Gonadenanlagen muß mit einer relativ geringen Ausbeute an primordialen Keimzellen gerechnet werden.

c) Die Pks befinden sich noch im Stadium reger Mitoseaktivität, während nur ein sehr geringer Teil weiblich determinierter Zellen bereits in die meiotische Prophase eingetreten ist; daher noch relativ viele "echte" PKs.

d) Die Reindarstellung der PKs fällt i. d. R. aufgrund ihrer deutlichen morphologischen Merkmale und der geringen Kontamination durch somatische Zellen leicht.

II. Spätere Stadien:

a) Die Geschlechtsbestimmung der Feten ist möglich aufgrund deutlich ausgeprägter Unterscheidungsmerkmale der Gonaden (-anlagen).

b) Da sich die Gonaden (-anlagen) zu räumlich isolierten Organen entwickeln und ihre ehemals enge Verbindung zum mesonephrotischen Gewebe allmählich lösen, wird ihre Präparation wesentlich erleichtert.

c) Die Kolonisation der sich entwickelnden Gonaden ist abgeschlossen; daraus resultiert eine höhere Gesamtausbeute an PKs, aber auch ein höherer Anteil bereits differenzierter Keimzellen.

d) Die beginnende Vaskularisierung der Organe und die Zunahme bindegewebiger Strukturen verursachen eine deutlich höhere Kontamination durch somatische Zellen.

4.1.2 Morphologie der Gonaden (-anlagen) als Kriterium zur Geschlechtsbestimmung der Feten

Da die Unterscheidungsmerkmale undeutlicher ausgeprägt sind, ist bei den drei beschriebenen Nutztierspezies die Geschlechtsbestimmung der Feten in vivo schwieriger als bei der Maus, kann jedoch ab einem tierartspezifischen Entwicklungszeitpunkt sicher durchgeführt werden.

Dies gelingt beim Rind ab einer SSL von 34 mm, beim Schwein ab Tag 29 der Gravidität und beim Kaninchen ab Tag 18.

Relativ zur Gesamtgestationsdauer beträgt der Zeitraum, der bis zur Geschlechtsdiagnose anhand morphologischer Kriterien vergeht, bei der Maus 57 %, beim Kaninchen 58 %, beim Schwein 25 % und beim Rind 15 %.

Tab. 6 gibt einen Überblick über die zur Geschlechtsdiagnose ermittelten Daten, die in Abb. 8 graphisch dargestellt sind.

Tab. 6: Geschlechtsdiagnose anhand der in vivo Gonadenmorphologie

	Maus	Kanin.	Schwein	Rind
SSL (mm)				34
Alter (dpc)	12	18	29	ca.40
Gestationsdauer (d)	21	31	115	270
Geschl.diagn. mögl.nach x % der Gest.dauer	57	58	25	15

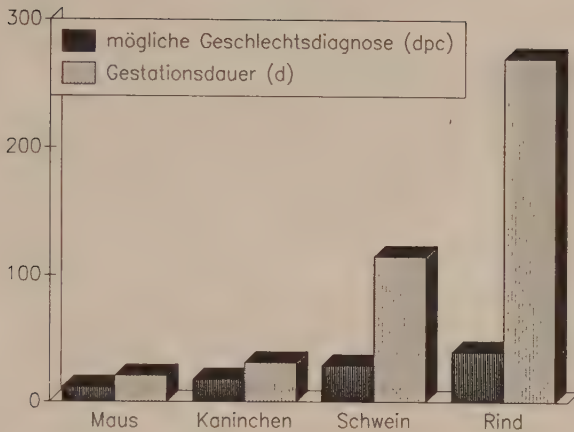


Abbildung 8: Zeitpunkt der Geschlechtsdiagnose der Feten anhand morphologischer Kriterien in Relation zur Gestationsdauer

Die männlich determinierten Anlagen weisen durch die beginnende Bildung der Tubuli seminiferi eine typische Streifenbildung auf, während die Anlagen der Ovarien im Lichtmikroskop eine homogene, allenfalls leicht gepunktete Struktur erkennen lassen (Abb. 9).



Abbildung 9: Weibliche Gonaden von Kaninchenfeten, 19 dpc.

Die im weiteren Verlauf der Entwicklung einsetzende Ausprägung der Tunica albuginea läßt die sich entwickelnden Hoden kompakt und lichtundurchlässig erscheinen, wodurch die Streifung nicht mehr erkennbar ist. Zum selben Zeitpunkt sehen die Ovarianlagen in gleichaltrigen weiblichen Feten fragiler aus und sind noch geringfügig lichtdurchlässig.

Zu einem noch weiter fortgeschrittenen Entwicklungszeitraum (Rind: 53 mm SSL; Schwein: o.A. ; Kaninchen: Tag 21) ist an den sich entwickelnden Hoden eine deutliche Oberflächenvascularisierung zu sehen, die den Ovarianlagen fehlt (Abb. 10).



Abbildung 10: Oberflächenvaskularisierung der Hoden eines ca. 80-dpc Rinderfeten. Das links abgebildete Organ zeigt noch Verbindung zum Mesonephros.

4.1.3 Isolation der primordialen Keimzellen

4.1.3.1 Methode der Zellgewinnung

4.1.3.1.1 Mechanisch

Das Zerdrücken der Gonaden (-anlagen) nach deren Loslösung von den Mesonephren zwischen einem Objektträger und einem aufgelegten Deckglas mit dem Ziel, dadurch die PKs freisetzen und isolieren zu können, hat sich bei den untersuchten Nutztierspezies nicht bewährt. Bedingt durch den im Vergleich zur Maus erheblichen Größenunterschied der Organe lag bei dieser

Methode eine unübersichtliche Zellmasse vor, aus der einzelne PKs nur unter großem Zeitaufwand isoliert werden konnten. Auch ein vorheriges Zerteilen der Organe mittels eines Skalpellts bewährte sich nicht, da auf diese Weise zu viele PKs verloren gingen.

4.1.3.1.2 EDTA / mechanisch

Die Methode, die freipräparierten Gonaden (-anlagen) für 10-15 Minuten in einer 0,02 %igen EDTA-Lösung zu inkubieren, sie anschließend in frisches Medium zu überführen und mit einer sehr feinen Kanüle zu punktieren, stellte sich als die geeignete heraus. Hierbei wurde nach individueller Beurteilung des jeweils vorliegenden Materials entschieden, welche Dauer der Inkubation angebracht erschien und wie häufig punktiert werden mußte. Eine schonendere Behandlung wurde angewendet bei Organen früher Entwicklungsstadien, die aufgrund ihrer noch sehr innigen Verbindung zu den Mesonephren bei der Präparation leicht beschädigt werden konnten. Gonaden älterer Feten konnten länger inkubiert und häufiger punktiert werden, obwohl dies wiederum die Gefahr einer massiven Kontamination durch somatische Zellen in sich barg. Bei einigen Gonaden männlicher Rinderfeten hatte sich das Abpräparieren der Tunica albuginea vor der Inkubation bewährt.

4.1.3.2 Morphologie der PKs

Während bei Schwein und Kaninchen unmittelbar nach der chemisch-mechanischen Behandlung der Gonaden (-anlagen) die PKs meistens einzeln und nur selten in Gruppen von ca. 2 - 6 Zellen vorzufinden waren (Abb. 11), lagen die PKs vom Rind in der Regel in Gruppen von einigen wenigen Zellen oder in

Klumpen von ca. 15 - 30 PKs vor (Abb. 12). Mit zunehmendem Alter der Feten wurden solche Aggregationen vermehrt beobachtet. In den meisten Fällen konnten die Verklumpungen leicht durch mehrmaliges Pipettieren in einer Mikropipette gelöst werden.

Abbildung 11:
PKs vom Schwein,
27 dpc

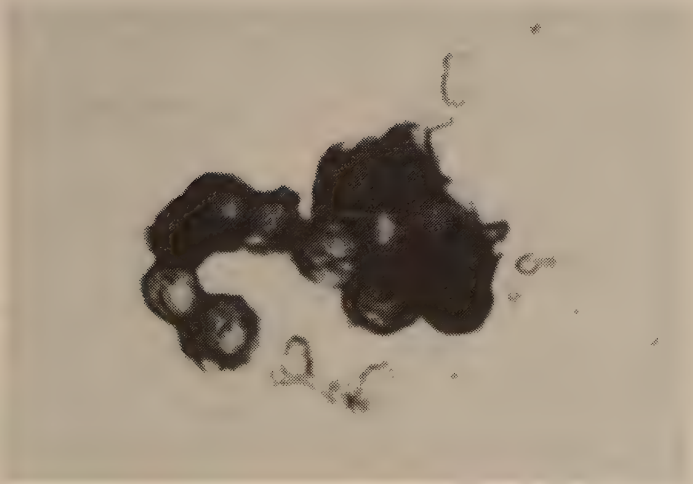
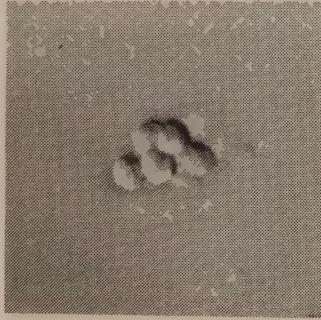


Abbildung 12: PKs vom Rind, ca. 80 dpc. AP-Färbung positiv.

Das Erscheinungsbild vereinzelter PKs bei Kaninchen, Schwein und Rind zeigt deutliche Übereinstimmung mit den bei der Maus gefundenen Strukturen, insbesondere Zellen sehr früher Stadien ähneln denen der Maus wesentlich häufiger als die älterer (Abb. 13).

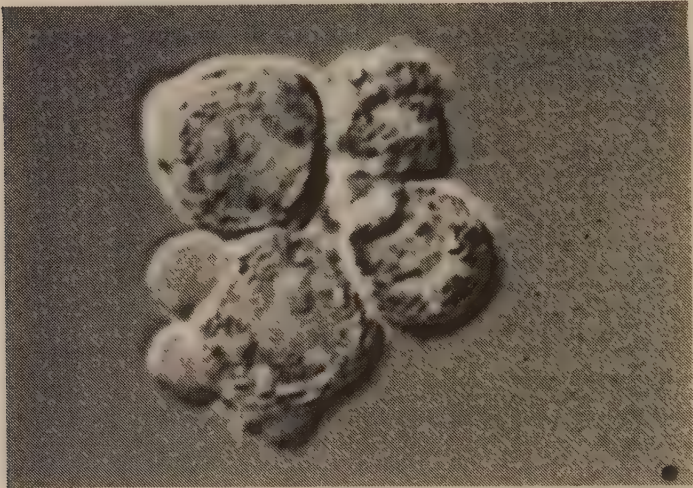


Abbildung 13: PKs der Maus, 16 dpc. "Blebbing" der links unten abgebildeten Zelle.

Die als "blebbing" bezeichnete Blasenbildung des Zytoplasmas, die bei Mäuse-PKs fast immer erkennbar war, wurde bei PKs von Schwein und Rind nicht immer beobachtet, häufig waren die Zellen abgerundet (Abb. 14).

Das Vorhandensein pseudopodienähnlicher Zellfortsätze wurde beim Schwein nie und beim Rind nur selten gesehen (max. 10% zeigten diese Auffälligkeit, allerdings in deutlicher Ausprägung; Abb. 15).

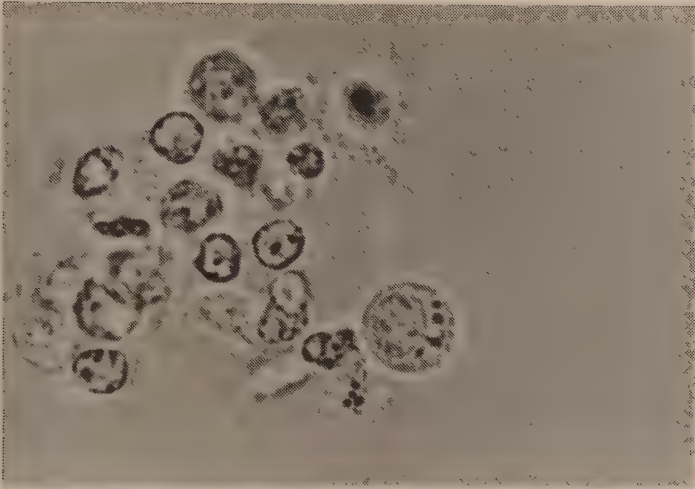


Abbildung 14: Einzelne PK (re. unt.) vom Rind, ca. 80 dpc, anliegend einer Aggregation somatischer Zellen

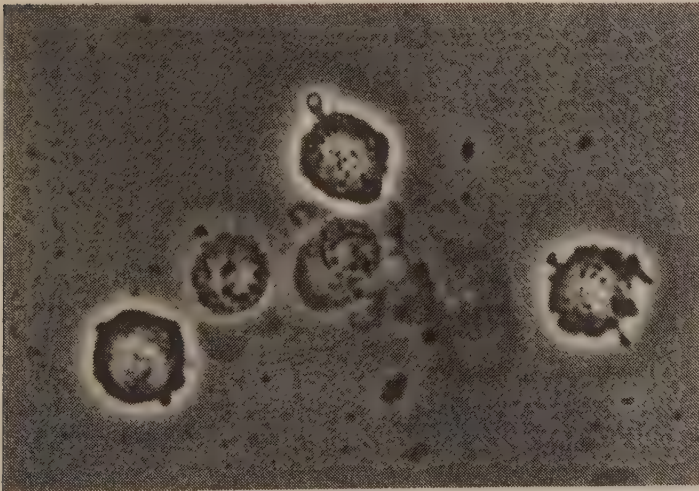


Abbildung 15: Einzelne PKs vom Rind mit zytoplasmatischen Auszügen, ca. 70 dpc

Abb. 16 und 17 sind lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen der Gonadenanlage eines Rinderfeten mit einer SSL von 15 mm mit vereinzelt PKs, die sich vor allem durch ihre Größe vom somatischen Zellverband abheben.

Abb. 18 zeigt das elektronenmikroskopische Bild einer PK desselben Rinderfeten. Deutlich erkennbar sind neben dem großen Kern und einer Vielzahl relativ großer Mitochondrien mehrere Auszüge der Zelloberfläche, die Ähnlichkeit mit den in Abb. 15 gezeigten Strukturen aufweisen.

Die PKs vom Kaninchen konnten in fast allen Fällen nur schwer von somatischen Zellen unterschieden werden, weil sie im Gegensatz zu anderen untersuchten Tierarten fast nie die typische Blasen- und Pseudopodienbildung aufweisen; diese Beobachtung wurde nur einmal bei Zellen 22 Tage alter Feten gemacht. Außerdem tragen Pks vom Kaninchen nicht das günstige Merkmal, sich aufgrund ihrer Größe deutlich von den somatischen Zellen abzuheben.

Bei allen drei Spezies fiel das niedrige Kern/Plasma-Verhältnis auf, war aber im Zuge der Präparation der Zellen unter einem Stereomikroskop (Vergrößerung $\times 140$) nicht zu quantifizieren, sondern wurde unter einem inversen Mikroskop (Zeiss ICM 405; $\times 400$ bis $\times 600$) beurteilt.

4.1.3.3 Größe der PKs

Der Polymorphismus der Zellen sowie die Bildung von Zellklumpen erschwerte die exakte Bestimmung des Zelldurchmessers erheblich.

Der Durchmesser der gewonnenen PKs lag zwischen $9,5 \mu\text{m}$ und $20 \mu\text{m}$, wobei die PKs vom Rind (28 Messungen) durchschnittlich $18 \mu\text{m}$ maßen, die vom Schwein (25 Messungen) $13 \mu\text{m}$ und die vom

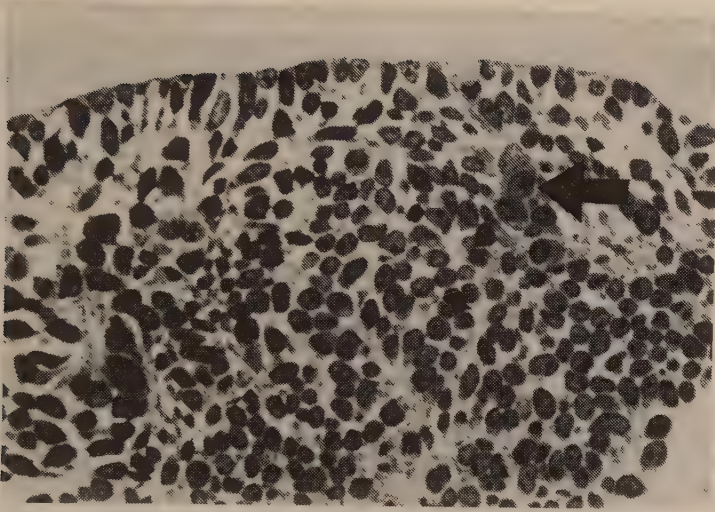


Abbildung 16: PKs im Verband mit somatischen Zellen, Rind

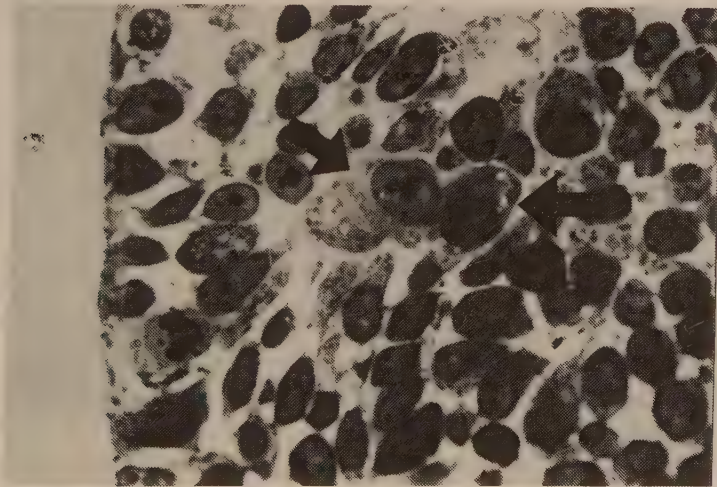


Abbildung 17: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 16

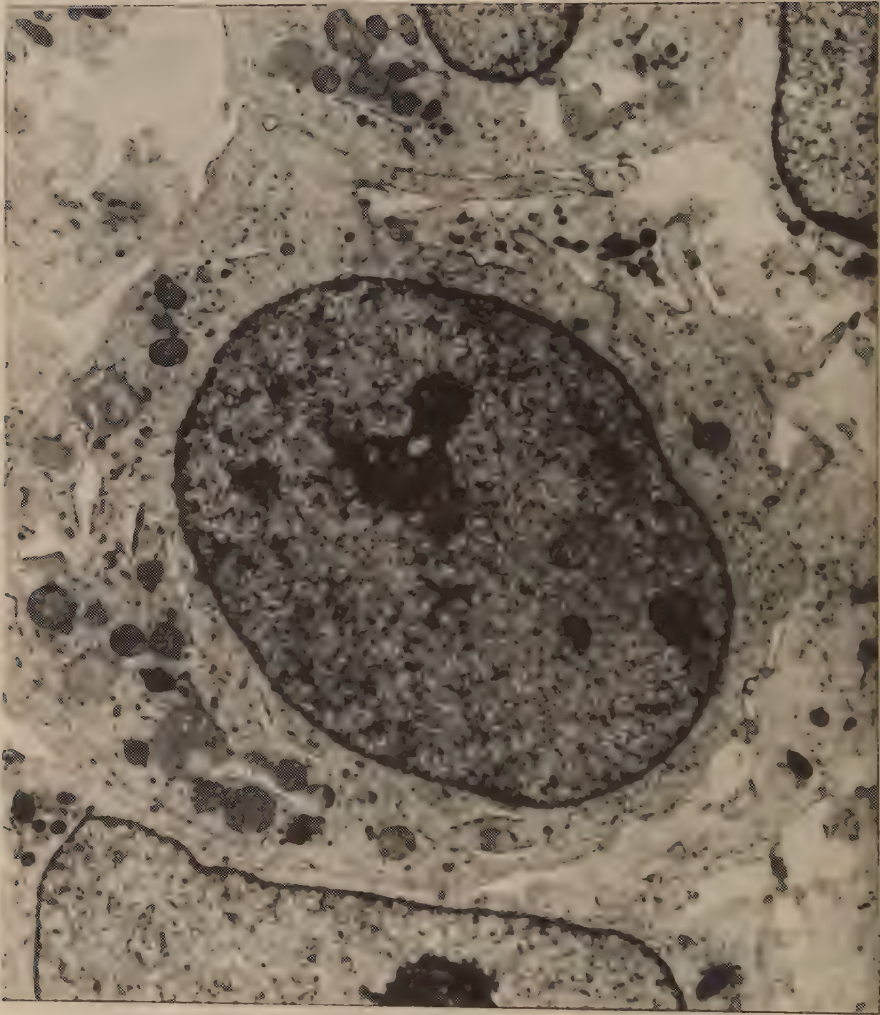


Abbildung 18: PK eines Rinderfeten, ca. 30 dpc.

Kaninchen (18 Messungen) 10,5 μm ; als Vergleichswert wurden bei der Maus (23 Messungen) 13 μm gefunden.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tab. 7: Zelldurchmesser der gewonnenen PKs (μm)

	n	$\bar{x}$	s
Rind	28	18,0	1,6
Schwein	25	13,0	1,4
Kaninchen	18	10,5	1,2
Maus	23	13,0	1,3

n=Anzahl der Messungen; $\bar{x}$ =Mittelwert; s=Standardabweichung

4.1.3.4 Vitalität der PKs sofort nach ihrer Freisetzung

Um überprüfen zu können, in welchem Ausmaß die PKs durch die in der Zeit zwischen der Tötung des Spendertieres und dem Beginn der Präparation auftretenden Noxen (Hypoxie, Azidose, Temperaturschwankungen) geschädigt werden und um den Ergebnissen der späteren in vitro Kultur bzw. Kryokonservierung einen entsprechenden Vergleichswert entgegensetzen zu können, wurde die Vitalität der PKs im unmittelbaren Anschluß an ihre Freisetzung bestimmt. Hierbei wurden folgende Werte ermittelt:

Bei der Maus wurden bei 6 Ansätzen durchschnittlich 85 % vitale PKs gefunden, wenn die Freisetzung der Zellen im unmittelbaren Anschluß an die Tötung des Spendertieres erfolgte. Wurde dieser Zeitraum auf ca. 90 Minuten aus-

gedehnt, waren es im Durchschnitt 71 %.

Beim Rind fanden sich in 2 Proben nach ca. 60 Minuten 40 %, nach ca. 90 Minuten (3 Proben) 46 %, nach ca. 120 Minuten (1 Probe) 27 % und nach ca. 3 Stunden und länger (2 Proben) nur noch 16 % vitale PKs.

Der Durchschnitt vitaler PKs vom Schwein lag nach ca. 90 Minuten (2 Proben) bei 33 %, nach ca. 120 Minuten (1 Probe) bei 72 %.

Beim Kaninchen ergab die Vitalitätsprüfung in 7 Ansätzen nach sofortigem Beginn der Präparation 67 % und nach ca. 60 Minuten (2 Proben) 79 %.

In Tab. 8 sind die Ergebnisse der sofort nach der Gewinnung der PKs ausgeführten Vitalitätsprüfungen zusammengestellt.

Tab. 8: Anteil lebensfähiger PKs sofort nach der Isolation in Relation zum Beginn der Präparation

	Maus		Rind				Schwein		Kanin.	
Beginn Präp. (min)	sof.	90	60	90	120	180	90	120	sof.	60
Anzahl Proben	6	5	2	3	1	2	2	1	7	2
Vitale PKs (%)	85	71	40	46	27	16	33	72	67	79

4.2 In vitro Kultur der primordialen Keimzellen

4.2.1 Veränderungen der Zellmorphologie

Bei allen Spezies wurde, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung, die Beobachtung gemacht, daß die zum Zeitpunkt der Gewinnung noch mehr oder weniger deutlichen morpholo-

gischen Besonderheiten der PKs im Laufe der Kultur in vitro in der Regel, aber keineswegs immer, verloren gehen.

Besonders beim Kaninchen, dessen PKs ja ohnehin schon schwer anhand morphologischer Kriterien zu selektieren waren, führte deren Verlust häufig zum Abbruch des Versuches, da die PKs nicht mehr von somatischen Zellen zu unterscheiden waren. PKs späterer Entwicklungsstadien lagen häufig schon bei ihrer Gewinnung in größeren Zellverbänden vor - besonders beim Rind. Zellen, die von jüngeren Feten stammten, zeigten mit zunehmender Dauer der in vitro Kultur auch eine verstärkte Verklumpungstendenz.

Ob die in Klumpen vorliegenden Zellen tatsächlich ihre typische Morphologie verloren hatten oder diese nur wegen der Verklumpung nicht mehr zu erkennen war, ist nicht sicher zu beurteilen.

Das Vorliegen z.T. recht großer Zellkonglomerate läßt nicht unbedingt einen Rückschluß auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu; so wurden bei einer allgemein guten Überlebensrate auch viele lebende PKs in Zellklumpen gefunden, während bei insgesamt schlechten Kulturergebnissen die in größeren Zellverbänden vorliegenden PKs i.d.R. abgestorben waren.

4.2.2 Vitalität der PKs nach definierter Dauer der in vitro Kultur

Die Beobachtung primordialer Keimzellen in vitro wurde dadurch erschwert, daß diese Zellen nicht adhärent wuchsen, sondern vielmehr die Tendenz zum Abschwimmen zeigten; diese Tendenz verstärkte sich mit zunehmender Kulturdauer.

Die maximale Dauer der in vitro Kultur lag bei Rind und Kaninchen bei 120 Stunden, beim Schwein bei 96 Stunden.

24-Stunden-Werte konnten beim Rind in 17 von 27 Ansätzen, beim Schwein in 8 von 13 Ansätzen (wobei in 2 Fällen wegen einer vorangegangenen Organkultur erst nach 72 Stunden eine Überprüfung stattfand) und beim Kaninchen in 4 von 6 Ansätzen ermittelt werden.

Die durchschnittliche Rate vitaler PKs nach dieser Zeit lag bei 57 % beim Rind, bei 58 % beim Schwein und bei 48 % beim Kaninchen.

Für mehr als 24 Stunden konnten vom Rind nur 2 Proben erfolgreich kultiviert werden, 8 Proben vom Schwein und 2 Proben vom Kaninchen.

In Tab. 9 sind die Zahlenwerte zusammengestellt und in Abb. 19 graphisch wiedergegeben.

Beim Rind wurden als Spitzenwerte der 24stündigen in vitro Kultur 82% (weiblich), 95% (männlich) und 89 % (Geschlecht unbekannt) gefunden. Als Durchschnittswerte wurden bei PKs von weiblichen Feten (7 Proben) 49 %, bei denen von männlichen (5 Proben) 61 % sowie bei denjenigen von Feten unbekannten Geschlechts (5 Proben) 63 % ermittelt.

Tab. 10 zeigt die Ergebnisse der in vitro Kultur von Rinder-PKs in der Zusammenfassung.

Tab. 9: Übersicht über die in vitro kultivierten Proben,
maximale Dauer der in vitro Kultur und Überlebensrate
der PKs nach 24 Stunden

	Rind	Schwein	Kaninchen
Ansätze (n)	27	13	6
IvK für 24 Stdn. (n)	17	8	4
IvK für 48 Stdn. u. länger (n)	2	8	2
Max. Dauer der ivK [Std.]	120	96	120
Vitale PKs nach 24 Std.			
a) im Durchschnitt (%)	57	58	48
b) Maximal (%)	95	88	80

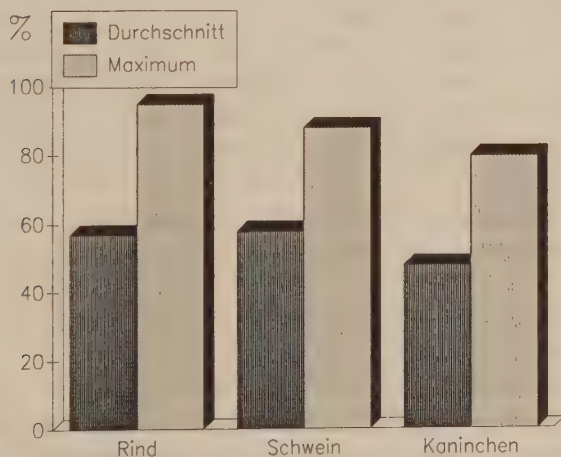


Abbildung 19: Durchschnittlicher und maximaler Anteil vitaler
PKs nach 24stündiger in vitro Kultur

Tab. 10: Ergebnisse der in vitro Kultur primordialer
Keimzellen des Rindes (Vitale Zellen in %)

SSL (mm)	Sex ¹⁾	Medium	Temp. (° C)	Vital.prüfung nach x Stunden				
				24	48	72	96	120
14	u	M2	RT	47	-	-	-	-
24	u	MEM	37	72	-	-	-	-
28	u	M2	RT	19	-	-	-	-
28	u	M2	RT	87	-	-	-	-
37	m	M199	37	75	77	62	74	78
38	m	M2	37	39	-	-	-	-
45	u	M2	37	89	-	-	-	-
55	m	MEM	37	60	-	-	-	-
57	w	MEM	37	72	-	-	-	-
69	w	M2	RT	59	-	-	-	-
70	m	M2	RT	95	-	-	-	-
80	w	M2	37 ²⁾	40	-	-	-	-
88	w	M2	RT	3	-	-	-	-
90	w	M2	37 ²⁾	49	18	-	-	-
92	w	MEM	37	82	-	-	-	-
110	m	M2	37	36	-	-	-	-
120	w	MEM	37	40	-	-	-	-

1) u= unbekannt, w= weiblich, m= männlich

2) Organkultur bei 37° C

Beim Schwein lagen die Spitzenwerte bei 88% (weiblich), 80% (männlich), 82% (gepoolt) und durchschnittlich 73 % für weibliche, 54 % für männliche und 52 % für gepoolte PKs bzw. solche unbekannten Geschlechts.

In Tab. 11 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tab. 11: Ergebnisse der in vitro Kultur primordialer
Keimzellen des Schweines (vitale Zellen in %)

Alter (d)	Sex ¹⁾	Medium	Temp. (° C)	Vital.prüfung nach x Stunden			
				24	48	72	96
23)	u	M2	37	17	-	-	-
27	u	M199	37	62	59	-	-
32	m	M2	RT	28	25	9	-
32	w	M2	RT	58	28	16	12
34	m	M2	RT	80 ²⁾	-	-	-
34	w	M2	RT	88	-	40	-
35	u	M199	37	45	38	-	-
35	w/m	M2	37	82	15	-	-
41	m	M2	37 ⁴⁾	-	-	30	-
41	m	M2	37 ⁵⁾	-	-	62	-

1) u = unbekannt, m= männlich, w= weiblich

2) geschätzt

3) SSL = 15 mm

4) Organkultur 37° C für 24 Std.

5) Organkultur 37° C für 30 Min.

Bei den Zellen vom Kaninchen wurden als Maximalwerte der 24stündigen in vitro Kultur 80% (weiblich), 75% (männlich) und für Zellen von Feten unbekannten Geschlechts 19 % gefunden. Der Durchschnittswert für weibliche PKs (2 Proben) lag bei 48 %; bei PKs männlichen und unbekannten Geschlechts lag jeweils nur eine Probe vor.

Tab. 12 zeigt die Ergebnisse für die PKs vom Kaninchen in zusammengefaßter Form.

Tab. 12: Ergebnisse der in vitro Kultur primordialer Keimzellen des Kaninchens (vitale Zellen in %)

Alter (d)	Sex ¹⁾	Medium	Temp. (° C)	Vital.prüfung nach x Stunden				
				24	48	72	96	120
18	u	M2	37	19	-	-	-	-
21	w	M199	RT	16	-	-	-	-
22	m	M199	37	75	70	57	71	50
22	w	M199	37	80	75	54	63	51

1) u = unbekannt, m= männlich, w= weiblich

Abb. 20 zeigt für jede untersuchte Spezies Durchschnitts- und Maximalwerte der Überlebensrate nach 24-stündiger in vitro Kultur in Relation zur Geschlechtszugehörigkeit in graphischer Darstellung.

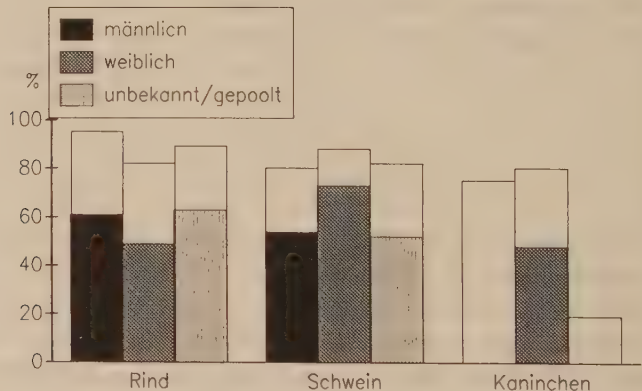


Abbildung 20: Überlebensrate nach 24stündiger in vitro Kultur in Relation zur Geschlechtszugehörigkeit
(gefüllte Boxen: Durchschnitts, leere Boxen: Maxima)

Wuchs im Kulturgefäß ein Monolayer fibroblastenähnlicher Zellen, zeigten die PKs durchweg höhere Überlebensraten, während sie nach Isolierung in dem meisten Fällen schon nach 24 Stunden abgestorben waren. Allerdings trat bei den Monolayerkulturen die Schwierigkeit auf, daß bei regem Wachstum fibroblastenähnlicher Zellen die PKs überwuchert wurden und somit der weiteren Beobachtung nicht mehr zugänglich waren.

Ein großes Problem stellte das gestörte Verhältnis Zellen / Medium dar, weil in einem für die Handhabung der Kulturgefäße unerläßlichen Mindestvolumen des Mediums eine viel zu geringe Zellzahl suspendiert wurde.

Microtestplatten, die ein bedeutend geringeres Volumen zuließen, konnten nicht erfolgreich eingesetzt werden, weil ihre Handhabung unter dem Mikroskop, speziell beim Versuch der selektiven Entnahme von PKs, schwierig war.

4.3 Kryokonservierung

Da bislang keine Veröffentlichungen über Versuche zur Kryokonservierung von PKs vorlagen, wurden vor den Versuchen, vitale primordiale Keimzellen vom Nutztier durch eine geeignete Tiefgefrieremethode zu konservieren, zunächst PKs der Maus eingesetzt.

Die Gesamtzahl der Versuchsansätze für Untersuchungen zur Kryokonservierung der PKs beläuft sich auf 13 bei der Maus, 16 beim Rind, 10 beim Schwein und 67 beim Kaninchen.

Um überprüfen zu können, wie die PKs den Einfrier- und Auftauprozess überstanden hatten, wurde die Vitalität der Zellen in einigen Versuchen im unmittelbaren Anschluß an das Auftauen bestimmt.

Sofern entweder die Vitalität ausreichend und/oder genügend Zellmaterial wiedergefunden worden war, wurden die PKs in vitro kultiviert.

Hierbei wurde nach entsprechender Verdünnung des Tiefgefriermediums dasjenige Medium zur in vitro Kultur eingesetzt, das dem TGM als Basismedium gedient hatte.

4.3.1 Maus

4.3.1.1 Vitalität sofort nach dem Auftauen

Die Bestimmung erfolgte in 5 Fällen und die gefundenen Ergebnisse lagen zwischen 33 und 79 %; der Durchschnitt lag bei 56 %.

4.3.1.2 In vitro Kultur

In 9 Versuchsansätzen konnte eine in vitro Kultur für zumindest 24 Stunden durchgeführt werden; hier lag der prozentuale Anteil vitaler Zellen zwischen 2 und 82 %, der Mittelwert lag bei 49 %.

Bei drei Proben konnten nach 48 Stunden folgende Werte ermittelt werden: 28 % bis 56 % vitale PKs, durchschnittlich 43 %.

Dieselben Proben konnten noch weitere 24 Stunden kultiviert werden; hier fanden sich als 72-Stunden-Werte 4 % bis 25%, im Durchschnitt 11 %.

In Tab. 13 sind die Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen der tiefgefrorenen und aufgetauten PKs der Maus zusammengestellt.

Die drei Proben, bei denen eine 3tägige in vitro Kultur möglich war, zeigen folgende Merkmale:

Die Feten waren 13 Tage alt, als Tiefgefriermedium wurde

M 199 verwendet, das Einfrieren erfolgte nach der konventionellen Methode und die Zellen waren in LN₂ gelagert worden.

Tab. 13: Ergebnisse der Kryokonservierung primordialer Keimzellen der Maus (Vitale Zellen in %)

Alter (dpc)	Sex ¹⁾	TGM	TGP ²⁾	Lagerung	Vital.prüfung nach x Stunden			
					sof.	24	48	72
13	w	M199	-70	LN ₂	-	66	44	4
13	m	M199	-70	LN ₂	-	66	56	25
13	w/m	M199	-70	LN ₂	-	64	28	5
13	m	MEM	BC	LN ₂	-	71	-	-
14	w/m	MEM	BC	LN ₂	-	22	-	-
14	m	MEM	BC	LN ₂	-	82	-	-
14	w	MEM	BC	LN ₂	-	2	-	-
14	m	MEM	BC	LN ₂	-	14	-	-
14	w/m	MEM	BC	LN ₂	79	-	-	-
14	w/m	MEM	BC	LN ₂	62	-	-	-
14	w/m	M2	BC	-	32	50	-	-
15	w/m	MEM	BC	LN ₂	73	-	-	-
15	w/m	MEM	BC	LN ₂	33	-	-	-

1) w= weiblich, m= männlich

2) -70 = Kühlschranks/Tiefgefrierschranks,
BC = elektronisch gesteuert (BioCool)

4.3.2 Rind

4.3.2.1 Vitalität sofort nach dem Auftauen

Bei einer sofort nach dem Auftauen durchgeführten Prüfung ergab sich ein 61 %iger Anteil vitaler Zellen.

4.3.2.2 In vitro Kultur

Nach 24stündiger in vitro Kultur konnte der Anteil lebensfähiger Pks in 14 Fällen bestimmt werden. Der niedrigste Wert lag bei 2 %, der höchste bei 84 % und als Durchschnittswert wurden 45 % ermittelt.

6 Proben ergaben nach 48 Stunden 26 % als Minimal- und 77 % als Maximalwert, der Durchschnitt lag bei 51 %.

Nach 72stündiger Kultivierung wurden bei 7 Proben Werte zwischen 28 % und 72 % gefunden mit einem Mittelwert von 52 %. Nach weiteren 24 Stunden wurden bei 6 Proben Prozentwerte zwischen 50 und 76 gefunden, der Durchschnitt lag bei 66 %. 3 Proben konnten nach insgesamt 120 Stunden untersucht werden; hier wurden 39 % bis 63 % gefunden, der Durchschnitt lag bei 53 %.

Tab. 14 veranschaulicht die Daten zur Kryokonservierung der Rinder-PKs.

4.3.3 Schwein

4.3.3.1 Vitalität sofort nach dem Auftauen

Bei Überprüfung zweier Proben wurden durchschnittlich 53 % lebende PKs gefunden.

4.3.3.2 In vitro Kultur

Von insgesamt 10 Versuchsansätzen lieferten 8 Ergebnisse der in vitro Kultur nach 24 Stunden. Die Werte lagen zwischen 21 % und 85 %, der Durchschnitt bei 60 %.

Tab. 14: Ergebnisse der Kryokonservierung primordialer Keimzellen des Rindes (Vitale Zellen in %)

SSL (mm)	Sex ¹⁾	TGM	TGP ²⁾	Lagerung	Vital.prüfung nach x Stunden				
					sof.	24	48	72	96 120
25	u	MEM	-70	-70	-	17	-	-	- -
28	u	MEM	BC	LN ₂	61	-	-	-	- -
28	u	M199	-70	LN ₂	-	67	58	72	76 -
30	u	MEM	BC	LN ₂	-	75	-	-	- -
34	m	MEM	-70	-70	-	9	-	-	- -
37	m	M199	-70	LN ₂	-	47	41	45	50 -
37	w	MEM	BC	LN ₂	-	28	-	-	- -
42	w	MEM	BC	LN ₂	-	53	-	-	- -
42	w	M199	-70	LN ₂	-	84	77	72	71 63
42	w	M199	-70	LN ₂	-	49	49	42	71 39
52	w	MEM	BC	LN ₂	-	76	-	28	- -
53	m	MEM	BC	LN ₂	-	28	-	-	- -
65	m	M199	-70	LN ₂	-	48	57	66	77 -
67	m	M199	-70	LN ₂	-	52	26	38	53 57
85	m	M199	-70	-70	-	2	-	-	- -

1) u= unbekannt, w= weiblich, m= männlich

2) -70 = Kühlschranks/Tiefgefrierschranks,
BC = elektronisch gesteuert (BioCool)

Nach 48stündiger Kultivierung wurden für 3 Proben 7%, 18 % und 26 % vitale Zellen ermittelt, 17 % im Durchschnitt. Eine Probe ergab nach 72 Stunden 11 % lebende PKs (Tab. 15).

Tab. 15: Ergebnisse der Kryokonservierung primordialer Keimzellen des Schweines (vitale Zellen in %)

Alter (dpc)	Sex ¹⁾	TGM	TGP ²⁾	Lagerung	Vital.prüfung nach x Stunden			
					sof.	24	48	72
26	u	M199	-70	-70	-	21	18	-
27	u	M199	-70	-70	-	33	26	11
27	u	MEM	BC	LN ₂	-	85	-	-
28	u	MEM	BC	LN ₂	-	85	-	-
28	u	M199	BC	LN ₂	54	-	-	-
28	u	M199	BC	LN ₂	51	-	-	-
28	u	MEM	BC	LN ₂	-	42	7	-
28	u	MEM	BC	LN ₂	-	77	-	-
28	u	MEM	BC	LN ₂	-	69	-	-
29	w/m	MEM	BC	LN ₂	-	71	-	-

1) u= unbekannt, w= weiblich, m= männlich

2) -70 = Kühlschrank/Tiefgefrierschrank,
BC = elektronisch gesteuert (BioCool)

4.3.4 Kaninchen

Da vom Kaninchen im Vergleich zu den anderen bearbeiteten Tierarten ein größerer Probenumfang für die Versuche zur Kryokonservierung zur Verfügung stand (67 Ansätze), konnten zur Auswertung der Ergebnisse zwei Gruppen gebildet werden.

4.3.4.1 Bei -70° C gelagerte Zellen

4.3.4.1.1 Vitalität sofort nach dem Auftauen

Im unmittelbaren Anschluß an das Auftauen wurden 8 Proben untersucht: der niedrigste Wert für vitale Zellen lag bei 16 %, der höchste bei 64 % und der Durchschnitt war 41 %.

4.3.4.1.2 In vitro Kultur

Von insgesamt 37 Proben zeigten 29 nach 24stündiger in vitro Kultur überlebende PKs. Der Minimalwert lag bei 5 %, der Maximalwert bei 78 %. Als Durchschnittswert wurden 28 % ermittelt.

Nach 48 Stunden wurden in 13 Proben durchschnittlich 22 % vitale PKs gefunden, wobei der niedrigste Wert bei 2 % und der höchste bei 64 % lag.

Als 72-Stunden-Werte konnten bei 5 Proben ermittelt werden: Minimum 7 %, Maximum 50 % und Durchschnitt 29 %.

In einem Fall gelang die Kultivierung über 96 Stunden; hierbei wurden 72 % vitale PKs gefunden.

Tab. 16 gibt eine Übersicht über die bei dieser Gruppe gefundenen Werte.

Tab. 16: Ergebnisse der Kryokonservierung primordialer Keimzellen des Kaninchens, Lagerung bei -70°C

Alter (dpc)	Sex ¹⁾	TGM	Vital.prüfung nach x Stunden ²⁾				
			sof.	24	48	72	96
18	w	M199	-	11	-	-	-
18	m	M199	-	7	-	-	-
19	w	M199	-	13	-	-	-
19	w	M199	-	12	-	-	-
19	w	M199	-	49	8	-	-
19	w	M199	-	30	23	-	-
19	m	M199	-	24	3	-	-
19	w	MEM	-	50	9	-	-
19	m	MEM	-	5	-	-	-
20	w	M199	-	28	17	-	-
20	m	M199	-	24	12	-	-
20	m	M199	-	54	2	-	-
20	w	M199	-	17	23	7	-
20	m	M199	-	29	20	14	-
20	w	M199	-	50	19	-	-
20	m	M199	-	5	-	-	-
20	w	MEM	-	78	64	50	-
20	m	MEM	-	52	51	47	72
20	w	MEM	-	50	40	26	-
20	m	MEM	-	12	-	-	-
20	w	MEM	-	17	-	-	-
20	m	MEM	-	17	-	-	-
20	w	MEM	55	33	-	-	-
20	m	MEM	22	5	-	-	-
21	w	MEM	64	35	-	-	-
21	m	MEM	43	-	-	-	-
21	w	MEM	43	17	-	-	-
21	m	MEM	28	-	-	-	-
21	w/m	M199	-	18	-	-	-
21	w/m	M199	-	39	-	-	-
21	w	MEM	56	37	-	-	-
21	m	MEM	16	-	-	-	-

1) w= weiblich, m= männlich

2) Vitale Zellen in %

Alle Proben nach der konventionellen Methode eingefroren.

4.3.4.2 In LN₂ gelagerte PKs

4.3.4.2.1 Vitalität sofort nach dem Auftauen

Im unmittelbaren Anschluß an das Auftauen wurden 37 % vitale PKs ermittelt (1 Probe).

4.3.4.2.2 In vitro Kultur

Nach 24stündiger in vitro Kultur konnten in 24 der insgesamt 30 Proben vitale PKs nachgewiesen werden. Der niedrigste Wert lag bei 14 %, der höchste bei 77 % und der Durchschnitt bei 39 %.

Nach 48 Stunden ergaben 13 Proben folgende Werte: Minimum 7 %, Maximum 54 % und Durchschnitt 24%.

Nach 72 Stunden wurden in 7 Proben als niedrigster Wert 2 %, als höchster 9 % und im Durchschnitt 6% lebensfähige PKs gefunden.

Die Ergebnisse dieser Gruppe sind in Tab. 17 zusammengestellt.

Tab. 17: Ergebnisse der Kryokonservierung primordialer
Keimzellen des Kaninchens, Lagerung in LN₂

Alter (dpc)	Sex ¹⁾	TGM	TGP ²⁾	Vital.prüfung nach x Stunden ³⁾			
				sof.	24	48	72
18	m	M199	-70	-	41	7	-
19	w	M199	-70	-	67	47	2
19	m	M199	-70	-	17	-	-
19	w	M199	-70	-	46	45	6
19	w	M199	-70	-	56	24	7
19	w	M199	-70	-	49	-	-
19	m	M199	-70	-	49	-	-
19	w/m	M199	-70	-	22	18	-
19	w/m	M199	BC	37	-	-	-
20	w	M199	-70	-	36	9	-
20	m	M199	-70	-	19	19	-
20	w	M199	-70	-	34	16	3
20	m	M199	-70	-	37	13	9
20	w	M199	-70	-	38	22	9
20	m	M199	-70	-	20	14	6
21	w	M199	-70	-	54	22	-
21	m	M199	-70	-	14	-	-
21	w	M199	-70	-	77	54	-
21	m	M199	-70	-	36	-	-
21	w	MEM	BC	-	43	-	-
21	w	MEM	BC	-	16	-	-
21	m	MEM	BC	-	23	-	-
22	w	MEM	BC	-	51	-	-
22	m	MEM	BC	-	26	-	-
22	w	MEM	BC	-	66	-	-

1) w= weiblich, m= männlich

2) -70 = Kühlschranks/Tiefgefrierschranks,
BC = elektronisch gesteuert (BioCool)

3) Vitale Zellen in %

Abb. 21 stellt die Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen sofort nach dem Auftauen und nach 24stündiger in vitro Kultur in graphischer Form dar.

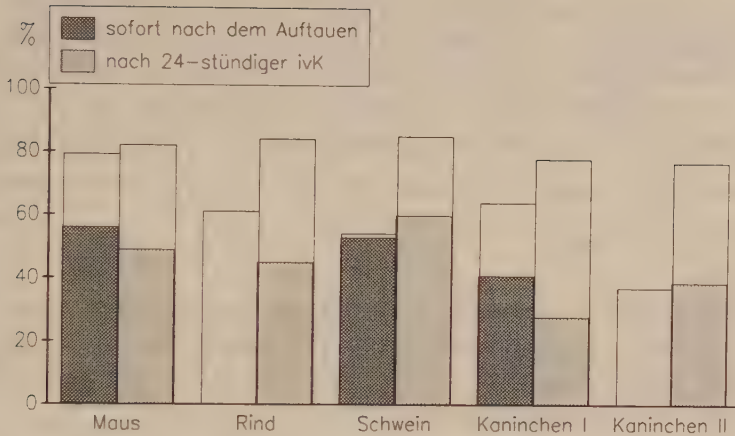


Abbildung 21: Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen sofort nach dem Auftauen und nach 24stündiger in vitro Kultur (gefüllte Boxen: Durchschnitt; leere Boxen: Maxima)

4.3.5 Ergebnisse der in vitro Kultur im Anschluß an das Auftauen in Relation zu Alter und Geschlecht der Feten

Aus den ermittelten 24-Stunden-Werten der in vitro Kultur wurden die nach dem Geschlecht der Feten getrennten Durchschnittswerte errechnet.

Hinsichtlich der Altersgruppierung wurde ebenso verfahren; bei Maus, Schwein und Kaninchen konnte nach Tagesaltersklassen unterschieden werden. Dagegen mußte beim Rind aufgrund der weitreichenden Altersverteilung eine Gruppenbildung erfolgen.

4.3.5.1 Maus

Die Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen der Mäuse-PKs zeigen hinsichtlich der Alters- und Geschlechtszugehörigkeit keine Zusammenhänge auf bzw. lassen wegen des zu geringen Stichprobenumfanges keine diesbezügliche Aussage zu (z. B. bei "weiblich" nur zwei 24-Stunden-Werte mit 2 % resp. 66 %).

4.3.5.2 Rind

Die Durchschnittswerte nach 24stündiger in vitro Kultur lagen bei PKs von weiblichen Feten (5 Proben) bei 58 %, bei denen von männlichen Feten (6 Proben) bei 31 % und bei denen von Feten unbekannten Geschlechts (3 Proben) bei 53 %.

In der Gruppe der Feten mit einer SSL von max. 30 mm (3 Proben) lag der Durchschnitt bei 53 %, in der Gruppe mit einer SSL zwischen 31 und 50 mm (6 Proben) bei 45 %, in der Gruppe mit einer SSL zwischen 51 und 70 mm (4 Proben) bei 51 %; PKs des männlichen Feten mit einer SSL von 85 mm zeigten 2 % vitale Zellen.

4.3.5.3 Schwein

Bei den 10 Versuchsansätzen zur Kryokonservierung der PKs vom Schwein war eine Geschlechtsdiagnose nur in einem Fall möglich. Hierbei waren die Zellen gepoolt worden.

Die 24-Stunden-Werte lagen für 26 Tage alte Feten (1 Probe) bei 21 %, für 27 Tage alte Feten (2 Proben) bei 59 %, für 28 Tage alte Feten (4 Proben) bei 68 % und bei 29 Tage alten Feten (1 Probe) bei 71 %.

4.3.5.4 Kaninchen

Bei den PKs, die bei -70°C gelagert worden waren, wurden für weibliche 33 %, für männliche 21 % und für gepoolte PKs (2 Proben) 29 % vitale Zellen nach 24 Stunden gefunden.

Bei 18 Tage alten Feten (2 Proben) wurden 7 % bzw. 11 % ermittelt, bei 19 Tage alten Feten (7 Proben) fanden sich durchschnittlich 26 %, bei 20 Tage alten Feten (15 Proben) waren es 31 % und bei 21 Tage alten Feten (5 Proben) lag der Durchschnitt bei 29 %.

Für PKs, die in LN_2 gelagert worden waren, fanden sich folgende Werte: 49 % als mittlerer 24-Stunden-Wert für PKs von weiblichen Feten (13 Proben), 28 % für diejenigen von männlichen (10 Proben) und 29 % für gepoolte PKs (1 Probe). Für PKs von 18 Tage alten Feten (1 Probe) wurden 41 % ermittelt, bei 19 Tage alten Feten (7 Proben) 44 %, bei 20 Tage alten Feten (6 Proben) waren es 31 %, bei 21 Tage alten Feten (7 Proben) waren es 38 % und bei 22 Tage alten Feten (3 Proben) wurde ein Durchschnitt von 48 % gefunden.

Tab. 18 und Tab. 19 geben eine Übersicht über die Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen nach 24stündiger in vitro Kultur der PKs unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht der Feten.

Abb. 22 gibt die Ergebnisse aus Tab. 18 in graphischer Darstellung wieder.

Tab. 18: Überlebensrate nach 24stündiger in vitro Kultur nach dem Auftauen in Beziehung zum Geschlecht der Feten

		Rind	Schwein	Kanin.1)	Kanin.2)
weibl.	(n)	5	-	16	13
durchschn.	[%]	58	-	33	49
maximal	[%]	84	-	78	77
männl.	(n)	6	-	11	10
durchschn.	[%]	31	-	21	28
maximal	[%]	52	-	54	49
pool	(n)	3	8	2	1
durchschn.	[%]	53	60	29	-
maximal	[%]	75	85	39	22

1) PKs bei -70°C gelagert

2) PKs in LN_2 gelagert

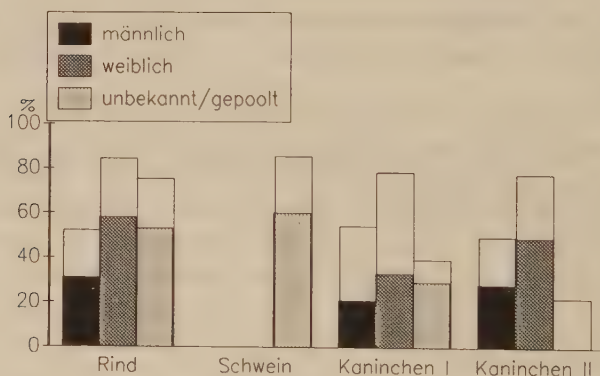


Abbildung 22: Ergebnisse der in vitro Kultur nach dem Auftauen in Relation zum Geschlecht

(gefüllte Boxen: Durchschnitte, leere Boxen: Maxima)

Bei der Betrachtung der Geschlechtszugehörigkeit fällt auf, daß beim Rind die weiblichen PKs sowohl im Durchschnitt als auch hinsichtlich des Maximalwertes den männlichen überlegen sind. Gleiches gilt für die PKs vom Kaninchen.

Tab. 19: Überlebensrate nach 24stündiger in vitro Kultur nach dem Auftauen in Beziehung zum Alter der Feten

		Rind	Schwein	Kanin. ¹⁾	Kanin. ²⁾
Altersklassen ³⁾					
I	(n)	3	1	2	1
	(%)	53	21	9	41
II	(n)	6	2	7	7
	(%)	45	59	26	44
III	(n)	4	4	15	6
	(%)	51	68	31	31
IV	(n)	1	1	5	7
	(%)	2	71	29	38
V	(n)	-	-	-	3
	(%)	-	-	-	48

1) PKs bei -70° C gelagert

2) PKs in LN₂ gelagert

3) Rind		Schwein	Kaninchen
SSL (mm)	(dpc)	(dpc)	(dpc)
I <30	<40	26	18
II 31-50	60	27	19
III 51-70	80	28	20
IV >71	>80	29	21
V -	-	-	22

Zwischen dem Alter der als PK-Donoren verwendeten Feten und dem Ergebnis der Vitalitätsprüfungen nach 24stündiger in vitro Kultur besteht beim vorliegenden Material kein Zusammenhang.

4.3.6 Einfluß des Tiefgefriermediums (TGM)

Die 24-Stunden-Werte der in vitro Kultur hinsichtlich der Überlebensfähigkeit der PKs wurden nach den jeweils verwendeten Tiefgefriermedien getrennt im Durchschnitt betrachtet.

4.3.6.1 M 199

PKs der Maus wurden in 3 Fällen mit M 199 eingefroren; dabei fanden sich im Durchschnitt 66 % vitale Zellen.

Beim Rind ergaben 7 Proben einen 24-Stunden-Durchschnitt von 50 %.

Für die PKs vom Schwein ergab sich ein 24-Stunden-Mittelwert von 27 % bei 2 Proben.

Beim Kaninchen zeigten diejenigen Zellen, die bei - 70° C gelagert worden waren, im Durchschnitt 26 % lebende Zellen (16 Proben).

Die in LN₂ gelagerten PKs zeigten durchschnittlich 40 % vitale Zellen.

4.3.6.2 MEM

Bei der Maus fanden sich durchschnittlich 38 % vitale Zellen nach 24stündiger Kultivierung (5 Proben).

PKs des Rindes zeigten in 7 Proben einen 24-Stunden-Mittelwert von 41 %.

Beim Schwein (6 Proben) lag der Mittelwert bei 72 %.

Für die PKs vom Kaninchen (bei - 70° C gelagert) fanden sich durchschnittlich 31 % (13 Proben).

Die in LN₂ gelagerten Kaninchen-PKs zeigten im Durchschnitt 38 % vitale Zellen (6 Proben).

In Tab. 20 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 20: Überlebensrate nach 24stündiger in vitro Kultur nach dem Auftauen in Beziehung zum verwendeten Tiefgefriermedium

	Maus	Rind	Schwein	Kanin. ¹⁾	Kanin. ²⁾
M 199 (n)	3	7	2	16	18
(%)	66	50	27	26	40
MEM (n)	5	7	6	13	6
(%)	38	41	72	31	38

1) PKs bei -70° C gelagert

2) PKs in LN₂ gelagert

4.3.7 Einfluß des Tiefgefrierprogramms (TGP)

4.3.7.1 Elektronisch gesteuert

Der 24-Stunden-Durchschnitt lag bei der Maus (6 Proben) bei 40 %, beim Rind (5 Proben) bei 55 %, beim Schwein (6 Proben) bei 72 % und bei den in LN₂ gelagerten PKs vom Kaninchen (6 Proben) bei 38 %; bei den bei -70° C gelagerten Kaninchen-PKs war diese Methode nicht angewendet worden.

4.3.7.2 Konventionelle Methode

Hier lag der durchschnittliche Anteil vitaler PKs nach 24stündiger in vitro Kultur bei der Maus (3 Proben) bei 65 %, beim Rind (9 Proben) bei 42 %, beim Schwein (2 Proben) bei 27 %; die bei -70°C gelagerten Kaninchen-PKs (29 Proben) lagen bei 28 % und die in LN_2 gelagerten (18 Proben) bei 40 %.

In Tab. 21 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse gegeben.

Tab. 21: Überlebensrate nach 24stündiger in vitro Kultur nach d. Auftauen in Beziehung zum eingesetzten Tiefgefrierprogramm

	Maus	Rind	Schwein	Kanin. ¹⁾	Kanin. ²⁾
BioCool (n)	6	5	6	-	6
(%)	40	52	72	-	38
konvent. (n)	3	9	2	29	18
(%)	65	42	27	28	40

1) PKs bei -70°C gelagert

2) PKs in LN_2 gelagert

4.3.8 Einfluß der Lagerung des tiefgefrorenen Zellmaterials auf dessen Überlebensfähigkeit

Alle PKs der Maus (9 Proben) waren in LN₂ gelagert worden; es fanden sich durchschnittlich 49 % lebende PKs nach der 24stündigen in vitro Kultur.

PKs vom Rind zeigten nach Lagerung bei -70° C einen 24-Stunden-Durchschnitt von 9 % (3 Proben); nach Lagerung in LN₂ (11 Proben) lag er bei 55 %.

Beim Schwein lag der Wert bei 27 % (2 Proben) nach Lagerung bei -70° C bzw. bei 72 % (6 Proben) nach Lagerung in LN₂.

PKs vom Kaninchen zeigten nach der Lagerung bei -70° C (29 Proben) 28 % vitale Zellen und nach Lagerung in LN₂ 39 % (24 Proben).

Tab. 22 gibt eine Übersicht über die ermittelten Werte, die in Abb. 23 graphisch dargestellt werden.

Tab. 22: Überlebensrate nach 24stündiger in vitro Kultur nach dem Auftauen in Beziehung zur Lagerungstemperatur

	Maus	Rind	Schwein	Kanin.
-70° C (n)	-	3	2	29
(%)	-	9	27	28
LN ₂ (n)	9	11	6	24
(%)	49	55	72	39

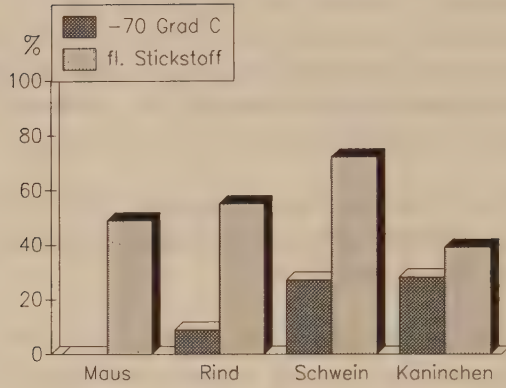


Abbildung 23: Einfluß der Lagerungstemperatur auf die Vitalität der PKs.

5. DISKUSSION

5.1 Gewinnung primordialer Keimzellen

Die Gewinnung primordialer Keimzellen von Rind, Schwein und Kaninchen stellt, zumindest ab einem bestimmten Alter der Feten, keine technische Schwierigkeit dar.

Ob die gewonnenen Zellen noch dem Status von "echten" PKs im Sinne der von NIEUWKOOP und SUTASURYA (1979) erarbeiteten Nomenklatur entsprechen, läßt sich nur anhand vergleichender Angaben zum Beginn der Differenzierungsvorgänge und dem Zeitpunkt der Isolation schätzen.

Als wesentlichstes Merkmal soll eine noch vorhandene Pluri- resp. Totipotenz dieser Zellen vorzufinden sein.

Die Methode der Zellgewinnung über EDTA-Inkubation und Punktion kann als geeignet angesehen werden, während die PKs durch die von DE FELICI und McLAREN (1982) beschriebene Methode der Collagenasebehandlung zu stark geschädigt werden. Obwohl hierbei mit einer weitaus höheren Zellausbeute zu rechnen ist als mit der nur mechanischen oder mit EDTA kombiniert mechanischen Methode, schränkt die erheblich reduzierte Vitalität der Zellpopulation die Eignung dieser Methode sehr stark ein.

Die Unbrauchbarkeit der Methode, die Gonaden (-anlagen) zwischen Objektträger und Deckglas zu zerquetschen, wurde bereits in Kapitel 4.1.3.1 erwähnt.

5.1.1 Bedeutung des Zeitverlustes zwischen Schlachtung des Spendertieres und Beginn der Präparation

Bei dem Versuch, eine Zellpopulation in möglichst gutem Zustand für die weitere Kultur und Erhaltung der Lebensfähigkeit zu gewinnen, ist es eine Selbstverständlichkeit, das

Material so schnell wie möglich in eine Umgebung zu verbringen, die den physiologischen Gegebenheiten weitgehend nahekommmt.

Während dies bei Labortieren und im vorliegenden Fall auch beim Kaninchen durch sofortige Entnahme der Feten nach der Schlachttötung und sich unmittelbar anschließende Präparation möglich war, mußte bei Rind und Schwein der durch die notwendigen Tätigkeiten im Zuge der Schlachtung entstehende Zeitverlust in Kauf genommen werden. Zum Vergleich wurden bei Maus und Kaninchen in einigen Fällen ebenfalls Vitalitätsprüfungen nach zeitlich verzögerter Präparation durchgeführt.

Da anzunehmen war, daß die Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen sofort nach der Freisetzung der PKs um so schlechter ausfielen, je länger dieser Zeitabstand gedauert hatte, entsprechen die ermittelten Werte bei der Maus mit 85 % (sofort) zu 71 % (nach 90 Minuten) den Erwartungen, wobei letztgenannter Wert noch immer als günstig zu beurteilen ist. Beim Rind ist mit 40 % (nach ca. 60 Minuten), 46 % (nach ca. 90 Minuten), 27 % (nach ca. 2 Stunden) und 16 % (nach ca. 3 Stunden und länger) zumindest eine in gleicher Richtung weisende Tendenz erkennbar. Überraschend sind die Ergebnisse beim Schwein und beim Kaninchen, wo nach protrahierter Dauer ein besseres Durchschnittsergebnis ermittelt wurde. Dies könnte unterschiedlich lebensfähigen PKs oder dem kleinen Stichprobenumfang zuzuschreiben sein.

Diese Problemstellung ist in der Literatur über Untersuchungen der Mäuse-PKs nicht diskutiert, da in diesen Versuchen eine sofortige Präparation der Feten bzw. des Zellmaterials erfolgte.

5.1.2 Morphologie und Größe der PKs

Die PKs der drei untersuchten Nutztierspezies entsprachen zwar weitgehend (mit Ausnahme der Zellen vom Kaninchen) der

bei der Maus beschriebenen Morphologie (DE FELICI und McLAREN, 1983; BRINSTER und HARSTAD, 1977), die erwähnten Merkmale waren aber nur in Einzelfällen ähnlich stark ausgeprägt.

Obwohl im Vordergrund dieser Arbeit eine Erhaltung der Vitalität der Zellen stand und nicht die Erhebung ins Detail gehender morphologischer Daten, kann für PKs des Rindes und des Schweines eine in vivo Morphologie bestätigt werden, die derjenigen der Mäuse-PKs ähnelt. Daß die Ausprägung pseudopodienähnlicher Zellfortsätze nur selten beobachtet werden konnte, entspricht der Beobachtung von PELLINIEMI (1976), wonach Schweine-PKs dieses Merkmal "manchmal" tragen.

Beim Kaninchen besteht das Problem, daß die PKs einerseits morphologisch sehr unscheinbar sind und sich außerdem nicht oder nur unzureichend mittels histochemischer Färbemethoden selektiv darstellen lassen.

Das von HARDISTY (1967) beschriebene niedrige Kern/Plasma-Verhältnis konnte zwar bestätigt werden, jedoch war wegen praktischer Gegebenheiten die Überprüfung im Zuge der routinemäßigen Präparation nicht möglich.

Der Verlust typischer morphologischer Kennzeichen der PKs in vitro könnte als Analogie zu den in vivo ablaufenden Differenzierungsvorgängen angesehen werden, d. h. daß nach einigen Tagen die gewonnenen Zellen nicht mehr als PKs bezeichnet werden dürften, sondern bereits als Oogonien bzw. Spermatogonien zu gelten hätten. Das bedeutet, daß diese Zellen auch nicht mehr über die ihren Vorläufern, den PKs, eigene Pluri- resp. Totipotenz im Sinne der Integrationsfähigkeit in embryonales Fremdmaterial verfügen.

5.2 In vitro Kultur der PKs

Die Versuche, PKs von Schwein, Rind und Kaninchen in vitro zu kultivieren, erbrachten durchweg nicht die erhofften Ergebnisse. Zwar waren bei jeder Spezies bemerkenswerte Spitzenwerte nach der 24stündigen Kultur zu verzeichnen (95 % beim Rind, 88 % beim Schwein und 80 % beim Kaninchen; sämtliche Werte von weiblichen PKs!), aber die Mittelwerte zeigen den ungünstigen Verlauf dieser Versuche (57 % beim Rind, 58 % beim Schwein und 48 % beim Kaninchen).

Der Gesamtdurchschnitt für die Kaninchen-PKs dürfte deshalb auf 48 % gefallen sein, weil zwei Ansätze mit 19 % bzw. 16 % unter äußerst ungünstigen Bedingungen kultiviert worden waren und bei einem größeren Probenumfang ein wesentlich besseres, dem Niveau der Proben mit 75 % bzw. 89 % vitalen PKs angepaßtes Ergebnis zu erwarten gewesen wäre.

Die maximale Dauer der in vitro Kultur erfüllte mit 96 Stunden beim Schwein und 120 Stunden bei Rind und Kaninchen nicht die Erwartungen, die PKs für zumindest eine Woche kultivieren zu können (HEATH, 1978 a).

Die Problematik der in vitro Kultur der PKs vom Nutztier zeigt Ähnlichkeit mit den Ergebnissen der Kulturversuche mit PKs der Maus (DE FELICI und McLAREN, 1983). Insgesamt ist eine stetig kleiner werdende Population vitaler PKs zu beobachten, wobei eine sichere Vitalitätsprüfung mit zunehmender Dauer der in vitro Kultur immer schwieriger wird. Das ergibt sich aus der bereits erwähnten Verklumpungstendenz und dem Verlust eindeutiger morphologischer Merkmale sowie der zunehmenden Schwierigkeit, die Zellen zwecks Überprüfung ihrer Vitalität dem Kulturgefäß zu entnehmen. Stoffwechselprodukte der Gesamtzellpopulation führen zu einer Schlierenbildung, die das selektive Entnehmen einzelner Zellen erschwert oder unmöglich macht.

Die Tatsache, daß die PKs in vitro nur anhand ihrer mor-

phologischen Ausprägung identifiziert wurden, sowohl lebende als auch tote PKs durch Schrumpfung die Gestalt somatischer Zellen annahmen und demzufolge immer weniger PKs - und dann i. d. R. vitale - als solche erkennbar waren, erklärt die in einigen Fällen höhere prozentuale Überlebensrate der Zellen nach längerer Kulturdauer.

Die von DONOVAN et al. (1986) und anderen erwähnte Methode der Identifizierung der PKs der Maus mittels radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper gegen spezifische PK-Antigene und der damit gegebenen Möglichkeit der Wiederfindung der markierten Zellen ist bei den untersuchten Nutztier-spezies bislang nicht anwendbar.

Die Beobachtung, daß in Organkulturen fetaler Mäuseovarien PKs für viele Tage überlebten und die Meiose den in vivo Vorgängen entsprechend durchliefen, ließ DE FELICI und McLAREN (1983) vermuten, daß von den somatischen Gonadenelementen "Faktoren" ausgehen, die für die normale Entwicklung der PKs von größter Bedeutung sind.

Diese Annahme wurde durch die Beobachtung gestützt, daß die PKs immer in der Nähe somatischen Zellmaterials vorzufinden waren, wenn Restmaterial des Gonadengewebes dem Kulturansatz zugegeben worden war.

Die beschriebenen Resultate der in vitro Kultur der PKs von der Maus werden durch das in vitro Verhalten der PKs vom Nutztier bestätigt. Die Beobachtung, daß gute bis befriedigende Ergebnisse der in vitro Kultur nahezu immer mit dem Wachsen fibroblastenähnlicher Zellen am Boden des Kulturgefäßes - zuweilen auch mit der Ausbildung eines geschlossenen Monolayers - einherging, läßt die Bedeutung anderer Parameter für die in vitro Kultur dieser Zellpopulation von untergeordneter Bedeutung erscheinen.

In die gleiche Richtung weisen die Ergebnisse von DONOVAN et al. (1986), die PKs von der Maus auf einem feeder-layer aus STO-Zellen kultivieren konnten.

Bereits die von WYLIE et al. (1979) und HEASMAN et al.

(1981) durchgeführten Experimente zur in vitro Kultur der PKs von *Xenopus laevis* auf Mesenterialzellen ließen derartige Zusammenhänge erkennen.

Bereits in Kap. 2.2.6.5 ist die Feststellung von DE FELICI und McLAREN (1983) zitiert, daß PKs im Zuge ihres physiologischen Entwicklungsablaufes niemals als isoliertes Gewebe existieren, sondern stets eng mit Zellen assoziiert sind, von denen sie sowohl nutritive Elemente als auch ihre Entwicklung bestimmende Signale erhalten.

Werden den PKs durch Isolation vom somatischen Gewebe diese Faktoren entzogen, ist die Retardierung ihrer Vitalität und der Verlust PK-typischer Merkmale nicht überraschend.

Da diese Faktoren bis heute nicht bekannt sind und es sich um das Zusammenspiel einer ganzen Reihe von Komponenten handeln dürfte, ist deren Substitution im Zuge der in vitro Kultur durch entsprechende Zusätze zum Kulturmedium nicht möglich. Der Einsatz eines in der Art von DONOVAN et al. (1986) beschriebenen feeder-layers, bestehend aus Zellen der Gonaden oder der Mesonephren und nach Ausbildung eines Monolayers durch entsprechende Maßnahmen (Bestrahlung, chemische Mitosehemmer) am weiteren Wachstum gehindert, wäre für die PKs vom Nutztier zu erproben. Hierdurch könnte in vitro ein Milieu geschaffen werden, das den Verhältnissen in vivo nahekommt.

In den im Zuge dieser Arbeit beschriebenen Kulturversuchen wurden Standardverfahren der Zellkultur eingesetzt. Da die Erprobung spezieller Medien für die Kultur extrem empfindlicher und nicht wachstumsfreudiger Zellen nach den von DE FELICI und McLAREN (1983) beschriebenen Versuchen zur Kultur von PKs der Maus auch für PKs vom Nutztier keine besseren Ergebnisse erwarten ließ, wurde auf deren Einsatz verzichtet.

Die Eigenart der PKs, zu migrieren, sich dabei umzugestalten und auszudifferenzieren, dürfte sie in höherem Maße vulnerabel gegenüber äußeren Einflüssen machen als dies der Fall

ist bei anderen Zellen fetalen Ursprungs, die sich im allgemeinen durch hohe Wachstumsfreudigkeit in vitro auszeichnen.

5.3 Kryokonservierung

Die unbefriedigenden Ergebnisse der Versuche, vitale PKs der drei bearbeiteten Nutztierspezies im Anschluß an ihre Gewinnung in vitro zu kultivieren, waren der Anlaß, das Schwergewicht der Untersuchungen auf die Methoden der Kryokonservierung zu verlegen.

Die Möglichkeit, die unmittelbar nach ihrer Isolation eingefrorenen PKs in hinreichend großer Zahl und guter Qualität nach dem Auftauen wiederzufinden, ist in zweierlei Hinsicht von Vorteil:

1. Zum einen kann die Problematik einer länger als wenige Stunden dauernden in vitro Kultur und der damit verbundenen Minderung der Vitalität der PKs umgangen werden; die Zellen stehen für jeden Versuchsansatz in "frischem" Zustand zur Verfügung, was sich besonders in jenen Fällen günstig auswirkt, in denen z. B. durch eine Asynchronität zwischen Donor und Rezipient eine Konservierung des Zellmaterials wünschenswert erscheint.

2. Die Tatsache, daß bei multiparen Spezies i. d. R. ein relativ großes Zellkontingent zur Verfügung steht, dessen Bearbeitung am selben Tag unmöglich ist bzw. mit der erwähnten Retardierung der Zellvitalität einhergeht, spricht ebenfalls für eine schnellstmögliche Konservierung des Materials. Außerdem ist die zeitlich unbegrenzte Konservierung genetisch identischer PKs ermöglicht.

5.3.1 Vitalität der PKs sofort nach dem Auftauen

Die Mittelwerte der sofort nach dem Auftauen durchgeführten Vitalitätsprüfungen lagen bei der Maus (56 %), beim Rind (61 %) und beim Schwein (53 %) über der 50 %-Marke.

Beim Kaninchen hingegen war mit durchschnittlich 41 % (bei -70°C gelagerte Zellen) bzw. 37 % (in LN_2 gelagerte Zellen) diese Grenze nicht erreicht worden. Allerdings ist die zuletzt genannte Zahl aufgrund einer nur einmalig durchgeführten Prüfung nicht ausreichend gesichert. Das insgesamt ebenfalls unbefriedigende Ergebnis der 24stündigen in vitro Kultur (39 %) spricht jedoch für eine zumindest tendenziell richtige Größenordnung.

Zum Vergleich seien die Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen im Anschluß an die Isolation der Zellen erwähnt:

Bei der Maus fanden sich sofort nach der Gewinnung durchschnittlich 85 % vitale PKs, sofort nach dem Auftauen 56 %. Beim Rind waren es nach ca. 60minütiger Verzögerung 40 % bei der sofort nach der Gewinnung durchgeführten Prüfung und 61 % im Anschluß an das Auftauen.

Beim Schwein waren es durchschnittlich 33 % sofort nach der Gewinnung (mit 90minütiger Verzögerung) und 53 % nach dem Auftauen.

Beim Kaninchen fanden sich ebenso wie bei der Maus bei der sofort nach der Gewinnung durchgeführten Vitalitätsprüfung mehr lebende Zellen (67 %) als bei der nach dem Auftauen durchgeführten (41 % für die bei -70°C gelagerten Zellen und 37 % für die in LN_2 gelagerten Zellen).

Die Werte sind in Tab. 23 gegenübergestellt.

Tab. 23: Vitalität der PKs sofort nach ihrer Gewinnung und sofort nach dem Auftauen (vitale Zellen in %)

Zeitpunkt:	Maus	Rind	Schwein	Kaninchen
unmittelbar nach				
Gewinnung	85	40 ¹⁾	33 ²⁾	67
Auftauen	56	61	53	41 ³⁾ 37 ⁴⁾
1) 60 min Verzögerung		2) 90 min Verzögerung		
3) bei -70° C gelagert		4) in LN ₂ gelagert		

5.3.2 In vitro Kultur im Anschluß an das Auftauen

Die Vitalität der PKs nach dem Prozeß des Tiefgefrierens und Wiederauftauens unterscheidet sich hinsichtlich der 24-Stunden-Werte nicht oder nur sehr geringfügig von den Durchschnittswerten der im Anschluß an die Gewinnung der PKs erfolgten in vitro Kultur.

Bei der Maus liegt kein eigener Vergleichswert zu der der Kryokonservierung angeschlossenen in vitro Kultur (49 %) vor. Beim Rind wurden durchschnittlich 45 % vitale PKs sowohl bei der sofortigen in vitro Kultur als auch bei der nach Kryokonservierung ermittelt.

Beim Schwein lagen diese Werte sehr nahe beieinander: 59 % vitale PKs bei sofortiger in vitro Kultur, 60 % bei der nach Kryokonservierung.

Beim Kaninchen ähneln sich die Werte der sofortigen in vitro Kultur (38 %) und derjenigen nach Kryokonservierung bei den PKs, die in LN₂ gelagert worden waren (39 %). Die bei -70° C gelagerten Zellen zeigten einen deutlich niedrigeren Durchschnitt (28 %).

Sieht man vom letztgenannten Probenkontingent (Kaninchen-PKs bei -70° C gelagert) ab, kann resümiert werden, daß die Vitalität der PKs durch die im Zuge der Kryokonservierung auf das Zellmaterial einwirkenden Noxen (Zytotoxizität des Kryoprotektivums, Dehydratation und Rehydratation der Zellen, Temperaturschwankungen) keine nennenswerte Beeinträchtigung erfährt.

Die Vergleichswerte der Vitalitätsprüfungen nach 24stündiger in vitro Kultur, die entweder sofort nach der Zellgewinnung oder nach der Kryokonservierung durchgeführt wurde, zeigt Tab. 24 in der Zusammenfassung.

Tab. 24: Vitalität nach 24stündiger ivK und dem Auftauen angeschlossener 24stündiger ivK (vitale PKs in %)

	Maus	Rind	Schwein	Kaninchen
nur ivK	-	45	59	38
ivK nach Auftauen	49	45	60	28 ¹⁾ 39 ²⁾

1) bei -70° C gelagerte Zellen

2) in LN₂ gelagerte Zellen

5.3.2.1 Ergebnisse der ivK nach dem Auftauen in Relation zum Geschlecht der Feten

Unter dem Aspekt der Geschlechtszugehörigkeit der Feten und einer damit verbundenen Aussage über unterschiedliches in vitro Verhalten der männlichen bzw. weiblichen PKs waren nur

Zellen des Rindes und des Kaninchens zu untersuchen, da das Material vom Schwein bis auf eine Ausnahme von Feten unbekannten Geschlechts stammte.

Mit Ausnahme der Werte vom Rind ließen bereits bei der im Anschluß an die Gewinnung durchgeführten in vitro Kultur die weiblichen PKs eine deutlich höhere Vitalität erkennen als die männlichen (Abb. 20).

Bei der nach der Kryokonservierung durchgeführten in vitro Kultur bestätigte sich die bessere Lebensfähigkeit weiblicher PKs ausnahmslos. Eine statistische Überprüfung (Chiquadrat-Test) ließ die hohe Wahrscheinlichkeit dieses Zusammenhangs erkennen, die Aussage ist aber wegen des geringen Stichprobenumfangs nicht sicher.

Um das Phänomen der höheren Vitalität weiblicher PKs erklären zu können, müßten die genauen Differenzierungsstadien der Zellen untersucht werden. Die sich anbahnende Zweigleisigkeit in der weiteren Entwicklung (mitotische Arretierung der männlichen Zellen, Eintritt in die Meiose der weiblichen) könnte einen Anhaltspunkt geben.

5.3.2.2 Vitalität der PKs in Relation zum Alter der Feten

Da die hier untersuchten Zellen ausnahmslos in Stadien gewonnen wurden, in denen eine noch stetige Zunahme ihrer Anzahl durch mitotische Teilungen zu verzeichnen ist, entsprechen die Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen den Erwartungen. Die beim Schwein festgestellte Zunahme des prozentualen Anteils vitaler Zellen mit fortschreitendem Alter dürfte in Anbetracht des pro Altersklasse untersuchten geringen Stichprobenumfangs zufällig sein.

Da nicht anzunehmen ist, daß eine halbwegs gute Überlebensrate der PKs gleichbedeutend einer den Zellen noch eigenen Pluri- resp. Totipotenz ist, wäre von weitaus größerem Interesse im Zusammenhang mit dem Alter der verwendeten

Feten die Frage, zu welchem Entwicklungsstadium die PKs der jeweiligen Spezies noch zu einer Integration in embryonales Fremdmaterial befähigt sind.

5.3.2.3 Einfluß des Tiefgefriermediums

Wegen der z. T. recht langwierigen Präparation der PKs von multiparen Tieren (an der Luft, in Raumtemperatur) und den damit verbundenen unphysiologischen Verhältnissen wurde das Hepes-gepufferte Medium M 199 als Präpariermedium und als Basismedium für das Tiefgefriermedium verwendet.

Ein deutlicher Einfluß ist jedoch nur bei der Maus zu beobachten, wo ein 24-Stunden-Durchschnitt von 66 % mit M 199 einem von 38 % mit MEM gegenübersteht. Außerdem war in allen 3 Proben, in denen Mäuse-PKs bis zu 72 Stunden kultiviert werden konnten, M 199 eingesetzt worden.

Beim Rind sind die Werte für M 199 (50 %) weniger deutlich erhöht als für MEM (41 %). Auffällig ist, daß alle 48-Stunden-Proben (n= 6), 6 der 7 72-Stunden-Proben, alle 96-Stunden-Proben (n= 6) und die 120-Stunden-Proben (n= 3) in M199 als Basismedium tiefgefroren und in demselben kultiviert wurden.

Die Zellen des Schweines lassen einen günstigeren Einfluß des MEM erkennen (72 % vitale PKs gegenüber 27 % mit M 199). Dies könnte im Gehalt an Bicarbonat begründet sein, dessen Zusatz zum Kulturmedium sich nach LINDL und BAUER (1987) sich besonders für die in vitro Kultur empfindlicher Zellen bewährt hat.

Bei allen Proben, die nach 24stündiger in vitro Kultur eine Überlebensrate der PKs von 42 % oder mehr zeigten, war MEM eingesetzt worden, sie waren mit dem elektronisch gesteuerten Gerät eingefroren und in LN₂ gelagert worden. Die beiden 24-Stunden-Proben mit 21 % bzw. 33 % vitaler Zellen waren mit M199 und mittels der konventionellen Methode eingefroren und bei -70° C gelagert worden.

Dagegen war die einzige Probe, die für 72 Stunden erfolgreich kultiviert werden konnte - wenn auch nur mit 11 % überlebenden Zellen - unter denselben Bedingungen eingefroren und gelagert worden.

5.3.2.4 Einfluß des Tiefgefrierprogramms

Eine deutlich höhere Vitalität der PKs nach 24stündiger in vitro Kultur zeigte sich bei Zellen der Maus, die mit der herkömmlichen Methode des Einfrierens der Zellen behandelt worden waren (65 % gegenüber 40% bei Verwendung des BioCool-Gerätes). Da jedoch nur 3 Proben mit dieser Methode eingefroren worden waren und bei denselben Proben M 199 zum Einsatz gekommen war, läßt sich nicht sicher sagen, welchem Parameter das günstigere Ergebnis zuzuordnen ist.

Dieselbe Problematik ergibt sich beim Schwein, da hier alle Proben, die unter elektronischer Steuerung eingefroren worden waren, in MEM kultiviert wurden.

Dagegen ergaben die beiden Proben, die elektronisch gesteuert unter Verwendung von M 199 eingefroren worden waren, bei der Überprüfung sofort nach dem Auftauen einen Durchschnittswert von 53 % vitaler Zellen, konnten aber nicht für 24 Stunden kultiviert werden.

Beim Rind war nur eine der 72-Stunden-Proben (MEM) mit dem BioCool-Gerät eingefroren worden, während die anderen mit der konventionellen Kühltisch- / Tiefgefrierschrank-Methode behandelt worden waren. Alle Proben, bei denen die Vitalitätsprüfung nach 96 Stunden oder später positiv ausfiel, waren mit der konventionellen Methode eingefroren worden.

5.3.2.5 Einfluß der Lagertemperatur

Aus versuchstechnischen Gründen hatte sich die Notwendigkeit ergeben, zunächst Einzelproben von PKs vom Kaninchen im Tiefgefrierschrank bei -70°C zu lagern. In Anbetracht des relativ großen Probenkontingentes bei dieser Tierart ist ein Vergleich der Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen jener Zellen, die bei -70°C gelagert wurden und jener, die im flüssigen Stickstoff aufbewahrt wurden, von größerer Aussagekraft als die der anderen untersuchten Tierarten, da die Anzahl der bei -70°C gelagerten Proben von Rind und Schwein sehr gering ist und lediglich der Überprüfung dieses Verfahrens dienen sollte. Die Statistik liefert einen Hinweis auf die hohe Wahrscheinlichkeit einer positiven Korrelation zwischen Lagerung in LN_2 und erhöhter Vitalität (Chiquadrat-Test), eine sichere Gesamtaussage ist aber wegen des geringen Stichprobenumfangs nicht möglich.

LINDL und BAUER (1987) beschreiben die Möglichkeit, Zellen auch weit oberhalb des Temperaturbereiches von LN_2 zumindest für einige Monate aufbewahren zu können. Die eigenen Ergebnisse sprechen jedoch dafür, das Zellmaterial alsbald in LN_2 zu verbringen, da einerseits die Temperatur von -70°C doch nicht niedrig genug zu sein scheint, um die Stoffwechselprozesse der Zellen in genügendem Maße zu reduzieren und andererseits die gleichmäßige Einhaltung dieser Temperatur nicht gewährleistet werden kann (z. B. durch häufiges Öffnen der Tür des Tiefgefrierschranks). Der Erfolg der Bemühungen um eine Kryokonservierung biologischen Materials, welcher Herkunft und Art es auch sei, dürfte durch die im letzten Fall eintretenden Temperaturschwankungen fraglos gemindert werden.

5.3 Ausblick

Unter Standardbedingungen ist es offensichtlich nicht möglich, primordiale Keimzellen der Nutztierspezies Rind, Schwein und Kaninchen nach ihrer Freisetzung über einen längeren Zeitraum erfolgreich *in vitro* zu kultivieren. Die beschriebene Methode des Einsatzes eines feeder-layers, der vor der Aussaat der PKs aus embryonalen Somazellen angelegt wird, steht für Nutztiere noch zur Erprobung aus. Da bei der Maus die Ergebnisse der *in vitro* Kultur dadurch verbessert wurden, ist auch mit einem positiven Einfluß auf das Verhalten der Nutztier-PKs *in vitro* zu erwarten.

Hierbei muß zunächst untersucht werden, welche Zelltypen sich zum Einsatz als feeder-cells eignen und auch permanent *in vitro* kultiviert werden können.

Die Kryokonservierung von PKs ist prinzipiell möglich. Der Einsatz anderer, noch besser geeigneter Tiefgefriermedien und Variationen der Zusätze sollte in weiterführenden Untersuchungen ebenso überprüft werden wie das Verlaufsprofil des Tiefgefrierprogramms. Auch die Behandlung des Zellmaterials nach dem Auftauen bedarf noch einer weitergehenden Betrachtung, wobei insbesondere zu untersuchen ist, welche Methode der Verdünnung des Tiefgefriermediums die günstigste ist.

Durch weitergehende Untersuchungen der PKs auf Mitose- bzw. Meioseaktivität könnte das für die Chimärenerstellung geeignete Entwicklungsstadium enger eingegrenzt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Feten der Nutztier-spezies Rind, Schwein und Kaninchen nach der Schlachtung der Spendertiere gewonnen. Freigesetzte primordiale Keimzellen wurden in vitro kultiviert bzw. zur permanenten Lagerung eingefroren.

Die Geschlechtsbestimmung der Feten anhand morphologischer Kriterien der Gonaden (-anlagen) gelang beim Rind ab dem ca. 40. Tag der Gravidität, beim Schwein ab Tag 29 und beim Kaninchen ab Tag 18.

Zur Freisetzung der PKs hat sich die Methode der EDTA-Inkubation und der anschließenden Punktion der Gonaden bewährt.

Die PKs vom Rind und vom Schwein zeigen morphologische Ähnlichkeit mit denen von der Maus, während die PKs vom Kaninchen sich nur schwer von somatischen Zellen unterscheiden lassen. Während der in vitro Kultur gehen die morphologischen Merkmale ("blebbing", Pseudopodien) i.d.R. verloren und die PKs neigen zur Verklumpung.

Eine erfolgreiche in vitro Kultur konnte beim Rind und beim Kaninchen über 120 Stunden, beim Schwein über 96 Stunden durchgeführt werden. Die durchschnittliche Anzahl lebender PKs nach 24stündiger Kultur lag beim Rind bei 57 %, beim Schwein bei 58 % und beim Kaninchen bei 48 %. Als Maximalwerte wurden für die einzelnen Tierarten 95 % (Rind), 88 % (Schwein) und 80 % (Kaninchen) ermittelt.

Die Cokultur mit fibroblastenähnlichen Zellen, die bei der Präparation nicht abgetrennt worden waren, ermöglichte häufig eine Verlängerung der Kulturdauer und brachte bessere Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen mit sich.

Die Kryokonservierung der PKs konnte mit Erfolg durchgeführt werden, wobei die herkömmliche Methode für das Einfrieren von Zellen (Kühlschrank/Tiefgefrierschrank) dem Einsatz eines elektronisch gesteuerten Einfriergerätes gleichwertig war.

Zum Vergleich waren PKs der Maus ebenfalls dieser Prozedur unterworfen worden. Sofort nach dem Auftauen durchgeführte Vitalitätsprüfungen ergaben für PKs vom Rind 61 %, vom Schwein 53 %, vom Kaninchen 41 % (Zellen bei -70° C gelagert) bzw. 37 % (Zellen in LN_2 gelagert) und von der Maus 56 % lebende Zellen.

Die dem Auftauen angeschlossene in vitro Kultur der PKs ergab nach 24 Stunden einen durchschnittlichen Anteil vitaler PKs in Höhe von 45 % beim Rind, 60 % beim Schwein, 28 % (bei -70° C gelagert) bzw. 39 % (in LN_2 gelagert) beim Kaninchen und 49 % bei der Maus. Folgende Maximalwerte wurden ermittelt: 84 % (Rind), 85 % (Schwein), 78 % (Kaninchen, bei -70° C gelagert), 77 % (Kaninchen, in LN_2 gelagert) und 82 % (Maus).

Die dem Auftauen und anschließender in vitro Kultur folgenden Vitalitätsprüfungen zeigten, daß sowohl die Maximal- als auch die Durchschnittswerte des prozentualen Anteils vitaler PKs bei weiblichen Zellen immer über den Werten der männlichen Zellen lagen.

Die Lagerung der PKs in flüssigem Stickstoff ist der Lagerung bei -70° C vorzuziehen.

7. SUMMARY

In vitro culture and cryopreservation of farm animals' primordial germ cells.

Within this study fetuses from cattle, pigs and rabbits were obtained after slaughtering of the donor animals. Isolated primordial germ cells (PGCs) were cultured in vitro or freezed for long-term storage.

The sex of the fetuses was distinguishable by morphological criteria of the gonads on and after day 40 (cattle), day 29 (pig) and day 18 (rabbit) of pregnancy.

PGCs were released directly into the culture medium by pricking the gonads with a fine needle. Pricking was preceded by incubation of the gonads for 10-15 minutes in 0.02 % EDTA solution.

Concerning their appearance cattle and pig PGCs were similar to mouse PGCs. Rabbit PGCs were hardly distinguishable from somatic cells. Morphological features such as blebbing and pseudopodia were lost during in vitro culture and the PGCs showed clumping.

Cattle and rabbit PGCs could be cultivated successfully in vitro for 120 hours, pig PGCs for 96 hours. The average number of living PGCs after 24 hours of in vitro culture was 57 % (cattle), 58 % (pig) and 48 % (rabbit). Maxima were 95 % (cattle), 88 % (pig) and 80 % (rabbit).

If fibroblast-like cells grew randomly within the same culture vessel, cultivating of the PGCs was prolonged and more viable cells were found.

Cryopreservation of PGCs was carried out successfully using a refrigerator and a deep-freeze system (-70°C). Similar results were obtained if cooling was done in programmed cooling rates by using a BioCool system (FTS).

Mouse PGCs were also frozen and thawed with intent to get comparable results. Immediately after thawing 61 % (cattle), 53 % (pig), 41 % (rabbit, cells kept at -70°C), 37 % (rabbit, cells kept in LN_2) and 56 % (mouse) living PGCs were seen.

In vitro culture after thawing gave the following results (after 24 hrs.): An average number of living PGCs of 45 % (cattle), 60 % (pig), 28 % (rabbit, cells kept at -70°C), 39 % (rabbit, cells kept in LN_2) and 49 % (mouse). Maxima were 84 % (cattle), 85 % (pig), 78 % (rabbit, cells kept at -70°C), 77 % (rabbit, cells kept in LN_2) and 82 % (mouse).

After thawing, female PGCs always showed higher rates of living cells than male PGCs did, concerning the averages as well as the maxima.

PGCs should rather be kept in liquid nitrogen than at -70°C .

8. LITERATURVERZEICHNIS

ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS,
J.D. WATSON, 1986

Molekularbiologie der Zelle
Weinheim: Verlag Chemie

BAUNACK, E., 1986

Persönliche Mitteilung

BAUNACK, E., M. KELLERMANN, 1986

Untersuchungen zum Entwicklungsschicksal von primordialen
Keimzellen bei Mäusen mittels Markierung mit Fluorescein-
isothiocyanat

Zuchthygiene 4, 148

BLACK, J.L., B.H. ERICKSON, 1963

Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig
Anat. Rec. 161, 45 - 56

BLANDAU, R.J., B.J. WHITE, R.E. RUMERY, 1963

Observations on the movements of the living primordial
germcells in the mouse

Fert. Steril. 14, 482 - 489

BRINSTER, R.L., H. HARSTAD, 1977

Energy metabolism in primordial germ cells of the mouse
Exp. Cell Res. 109, 111 - 117

CHIQUOINE, A.D., 1954

The identification, origin, and migration of the
primordial germ cells in the mouse embryo

Anat. Record 118, 135 - 145

CHIQUEINE, A.D., E.J. ROTHENBERG, 1957

A note on alkaline phosphatase activity of germ cells in
amblystoma and chick embryos

Anat. Record 127, 31 - 35

CHRETIEN, FR. CH., 1966

Etude de l'origine, de la migration et de la multi-
plication des cellules germinales chez l'embryon de
lapin

J. Embryol. exp. Morph. 16, 591 - 607

CLARK, J.M., E.M. EDDY, 1975

Fine structural observations on the origin and
associations of primordial germ cells of the mouse
Devel. Biol. 47, 136 - 155

DE FELICI, M., 1984

Binding of fluorescent lectins to the surface of germ
cells from fetal and early postnatal mouse gonads
Gamete Res. 10, 423 - 432

DE FELICI, M., G. SIRACUSA, 1985

Adhesiveness of mouse primordial germ cells to follicular
and Sertoli cell monolayers

J. Embryol. exp. Morph. 87, 87 - 97

DE FELICI, M., C. BOITANI, G. COSSU, 1985

Synthesis of glycoconjugates in mouse primordial germ
cells

Dev. Biol. 109, 375 - 380

DE FELICI, M., A. McLAREN, 1983

In vitro culture of mouse primordial germ cells

Exp. Cell Res. 144, 417 - 427

DE FELICI, M., A. McLAREN, 1982

Isolation of mouse primordial germ cells

Exp. Cell Res. 142, 476 - 482

DONOVAN, P.J., D. STOTT, L.A. CAIRNS, J. HEASMAN, C.C. WYLIE,
1986

Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells
behave differently in culture

Cell 44, 831 - 838

EDDY, E.M., J.M. CLARK, D. GONG, B.A. FENDERSON, 1981

Origin and migration of primordial germ cells in mammals

Gamete Res. 4, 333 - 362

EDDY, E.M., A.C. HAHNEL, 1983

Establishment of the germ cell line in mammals

In: Current problems in germ cell differentiation

Ed.: A. McLaren, C.C. Wylie

Cambridge University Press, 41 - 69

ENGLAND, M.A., 1983

The migration of primordial germ cells in avian embryos

In: Current problems in germ cell differentiation

Ed.: A. McLaren, C.C. Wylie

Cambridge University Press, 91 - 114

ERICKSON, B.H., 1966

Development and radio-response of the prenatal bovine
ovary

J. Repr. Fert. 11, 97 - 105

FIORONI, P., 1987

Allgemeine und vergleichende Embryologie der Tiere

Berlin: Springer

GOTTSCHESKI, G.H.M., W. ZIMMERMANN, 1973

Die Embryonalentwicklung des Hauskaninchens
Normogenese und Teratogenese
Hannover: M. u. H. Schaper

GROPP, A., S. OHNO, 1966

The presence of a common embryonic blastema for ovarian
and testicular parenchymal (follicular, interstitial and
tubular) cells in cattle, *bos taurus*
Z. Zellforsch. 74, 505 - 528

HARDISTY, M.W., 1967

The numbers of vertebrate primordial germ cells
Biol. Rev. 42, 265 - 287

HEASMAN, J., R.O. HYNES, A.P. SWAN, V. THOMAS, C.C. WYLIE,
1981

Primordial germ cells of *xenopus* embryos: The role of
fibronectin in their adhesion during migration
Cell 27, 437 - 447

HEASMAN, J., C.C. WYLIE, 1981

Contact relations and guidance of primordial germ cells
on their migratory route in embryos of *Xenopus laevis*
Proc. R. Soc. Lond. B 213, 41 - 58

HEATH, J.K., 1978 a

Mammalian primordial germ cells
In: Development in mammals, 3
Ed.: M.H. Johnson
New York: Elsevier, 267 - 298

HEATH, J.K., 1978 b

Characterization of a xenogeneic antiserum raised against
the fetal germ cells of the mouse: Cross-reactivity with
embryonal carcinoma cells

Cell 15, 299 - 306

HOGAN, B., F. COSTANTINI, E. LACY, 1986

Manipulating the mouse embryo

New York: Cold Spring Harbor Laboratory

JEON, K.W., 1972

Electron microscopic studies on primordial germ cells in
early mouse embryos

J. Cell Biol. 5, 125a

JEON, K.W., J.R. KENNEDY, 1973

The primordial germ cells in early mouse embryos: light
and electron microscopic studies

Dev. Biol. 31, 275 - 284

JOST, A., J. PRÉPIN, 1966

Données sur la migration des cellules germinales
primordiales du fœtus de veau

Archs. Anat. microsc. 55, 161 - 186

KREHBIEL, E.B., 1963

Differentiation of gonads in the bovine embryo

Kansas, U.S.A.: Ph. D. Thesis

LANGMAN, J., 1980

Medizinische Embryologie

Stuttgart: Thieme

LEICHTHAMMER, F., E. BAUNACK, G. BREM, 1988

Attempts to cryopreservation of mouse primordial germ cells

XXVI. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde, Basel, 13.-15.09.88

LEONHARDT, H., 1977

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen
Stuttgart: Thieme

LINDL, T., J. BAUER, 1987

Zell- und Gewebekultur
Stuttgart: G. Fischer

McLAREN, A., 1981

Germ cells and soma: A new look at an old problem
New Haven and London: Yale University Press

McLAREN, A., 1983 a

Primordial germ cells in mice
Biblthca. anat. 24, 59 - 66

McLAREN, A., 1983 b

Studies on mouse germ cells inside and outside the gonad
J. exp. zool. 228, 167 - 171

McLAREN, A., 1987

Personal communication

MEIER, E., 1983

Cryofixation von Skelettmuskelgewebe
München: Diss. med. vet.

MEYER, D.B., 1964

The migration of primordial germ cells in the chick
embryo
Dev. Biol. 10, 154 - 190

MONK, M., A. McLAREN, 1981

X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse
J. Embryol. exp. Morph. 63, 75 - 84

NIEUWKOOP, P.D., L.A. SUTASURYA, 1979

Primordial germ cells in the chordates
Cambridge University Press

NODEN, D.M., A. DE LAHUNTA, 1985

Derivates of the intermediate mesoderm: reproductive
organs
In: The embryology of domestic animals
Baltimore: Williams and Wilkins, 322 ff.

O, W.S., 1978

The interaction between the germinal and somatic cells in
gonadal differentiation and development
In: Development in mammals 3
Ed.: M.H. Johnson
New York: Elsevier, 229 -322

OHNO, S., A. GROPP, 1965

Embryological basis for germ cell chimerism in mammals
Cytogenet. 4, 251 - 261

OZDZENSKI, W., 1967

Observations on the origin of primordial germ cells in
the mouse
Zool. Pol. 17, 367 - 379

OZDZENSKI, W., 1969

Fate of primordial germ cells in the transplanted hind gut of mouse embryos

J. Embryol. exp. Morph. 22, 505 - 510

PELLINIEMI, L.J., 1975

Ultrastructure of gonadal ridge in male and female pig embryos

Anat. Embr. 147, 19 - 34

PELLINIEMI, L.J., 1976

Ultrastructure of the indifferent gonad in male and female pig embryos

Tissue and Cell 8, 163 - 174

PERTOFT H., T.C. LAURENT, 1977

Isopycnic separation of cells and cell organelles by centrifugation in modified colloidal silica gradients
In: Methods of cell separation 1

Ed.: N. Catsimpoolas

New York und London: Plenum Press, 25 - 65

PERTOFT, H., K. RUBIN, L. KJELLÉN, T.C. LAURENT,
B. KLINGEBORN, 1977

The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll (TM)

Exp. Cell Res. 110, 449 - 457

PHILLIPS, H.J., 1973

Dye exclusion tests for cell viability

In: Tissue culture

Ed.: P.F. Kruse, J.R. Patterson

New York und London: Academic Press, 406 - 408

- PRÉPIN, J., C. GIBELLO-KERVAN, G. CHARPENTIER, A. JOST, 1985
 Number of germ cells and meiotic prophase stages in fetal
 rat ovaries cultured in vitro
 J. Reprod. Fert. 73, 579 - 583
- PRETLOW II, T.G., T.P. PRETLOW, 1977
 Separation of viable cells by velocity sedimentation in
 an isokinetic gradient of Ficoll in tissue culture
 medium
 In: Methods of cell separation 1
 Ed.: N. Catsimopoulos
 New York und London: Plenum Press, 171 - 191
- RIVELIS, C., J. PRÉPIN, B. VIGIER, A. JOST, 1976
 Prophase méiotique dans les cellules germinales de
 l'ébauche ovarienne de rat cultivée in vitro en milieu
 anhormonal
 C. R. Acad. Sc. Paris 282, 1429 - 1432
- ROGULSKA, T., W. OZDZENSKI, A. KOMAR, 1971
 Behaviour of mouse primordial germ cells in the chick
 embryo
 J. Embryol. exp. Morph. 25, 155 - 164
- RÜSSE, I., 1978
 Ultrastruktur der Eizelle während der Oogenese
 Verh. Anat. Ges. 72, 839 - 851
- RÜSSE, I., 1983
 Oogenesis in cattle and sheep
 Biblthca. anat. 24, 77 - 92
- SCHNORR, B., 1985
 Embryologie der Haustiere
 Stuttgart: Enke

SHEELER, P., 1981

Choosing a solute for density gradient centrifugation:
Physical properties of sucrose, Metrizamide^R, Ficoll^R,
and Percoll^R
Sorvall^R Applications Brief No. 9

SHEVINSKY, L.H., B.B. KNOWLES, I. DAMJANOV, D. SOLTER, 1982

Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-
specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and
human teratocarcinoma cells
Cell 30, 697 - 705

SNOW, M.H.L., M. MOMK, 1983

Emergence and migration of mouse primordial germ cells
In: Current problems in germ cell differentiation
Ed.: A. McLaren, C.C. Wylie
Cambridge University Press, 115 - 135

SOLTER, D., B.B. KNOWLES, 1978

Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse
embryonic antigen (SSEA-1)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5565 - 5569

SPIEGELMAN, M., D. BENNETT 1973

A light- and electron-microscopic study of primordial
germ cells in the early mouse embryo
J. Embryol. exp. Morph. 30, 97 - 118

STARCK, D. 1975

Embryologie
Stuttgart: Thieme

STERNBACH, H., 1982

Dichtegradientenzentrifugation heute: Metrizamide^R,
Ficoll^R, Percoll^R
LaborPraxis 5, 482 - 484

TAM, P., M. SNOW, 1981

Proliferation and migration of primordial germ cells
during compensatory growth in mouse embryos
J. Embryol. exp. Morph. 64, 133 - 147

WABIK-SLIZ, B., A. McLAREN, 1984

Culture of mouse germ cells isolated from fetal gonads
Exp. Cell Res. 154, 530 - 536

WARTENBERG, H., 1983

Germ cell migration induced and guided by somatic cell
interaction
Biblthca. anat. 24, 93 - 110

WYLIE, C.C., J. HEASMAN, A.P. SWAN, B.H. ANDERTON, 1979

Evidence for substrate guidance of primordial germ cells
Exp. Cell Res. 121, 315 - 324

WYLIE, C.C., J. HEASMAN, A. SNAPE, M. O'DRISCOTT, S. HOLWILL,
1985 a

Primordial germ cells of *Xenopus laevis* are not
irreversibly determined early in development
Dev. Biol. 112, 66 - 72

WYLIE, C.C., D. STOTT, P.J. DONOVAN, 1985 b

Primordial germ cell migration
In: Developmental Biology; A Comprehensive Synthesis,
Vol. 2: The cellular basis of morphogenesis
Ed.: L. Browder
New York: Plenum Press, 433 - 448

ZAMBONI, L., H. MERCHANT, 1973

The fine morphology of mouse primordial germ cells in
extragonadal locations
Am. J. Anat. 137, 299 - 336

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Gottfried Brem danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung und für zahlreiche Hilfestellungen und Anregungen während der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Imogen Rüsse danke ich für die Anfertigung und Zurverfügungstellung licht- und elektronenmikroskopischen Bildmaterials sowie für hilfreiche Fachgespräche.

Bei Frau Dr. Eva Baunack bedanke ich mich für die instruktive Unterweisung im Umgang mit primordialen Keimzellen der Maus.

Für die stets gewährte, freundliche und verlässliche Mitarbeit bedanke ich mich bei Frau Tamara Holy, Frau Sigrid Müller, Frau Beate Rengel, Frau Maria Stangl und Herrn Josef Schäfler.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Annette Clement-Sengewald für ihre konstruktive Kritik und zahlreiche Hilfestellungen.

Darüberhinaus möchte ich mich bei Frau Ulrike Berg, Frau Dr. Elisabeth Gradl-Eisenmann und Frau Dr. Ellen Maier sowie bei Herrn Bernhard Hofmeister und Herrn Eckhard Wolf für die freundliche Unterstützung im Laufe meiner Arbeit bedanken.

Für die Bereitstellung der EDV-Auswertungsprogramme bedanke ich mich bei Herrn Stanglmeier.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

LEBENS LAUF

Name:	Frank Harry Leichthammer
Geburtsdatum:	27. April 1956
Geburtsort:	Frankfurt am Main
Vater:	Dr. rer. pol. Harry Leichthammer
Mutter:	Elfriede J. Leichthammer, geb. Schwarz
1963 - 1966	Besuch der Ludwig-Richter-Schule in Frankfurt
1966 - 1975	Besuch des Ziehen-Gymnasiums in Frankfurt
12. Mai 1975	Reifeprüfung
1975 - 1976	Grundwehrdienst
1977 - 1979	Buchhandelslehre
April 1980	Aufnahme des Studiums der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin
Oktober 1983	Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität München
9. Januar 1986	Abschluß des Dritten Abschnittes der Tierärztlichen Prüfung
12. März 1986	Approbation als Tierarzt
seit Okt. 1986	Doktorand am Institut für Tierzucht und Tierhygiene der Ludwig-Maximilians-Universität München

